

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 832**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2016 PCT/EP2016/066706**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2016 E 16739102 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3322717**

54 Título: **Nuevos péptidos y nuevas combinaciones de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el cáncer epitelial de ovario y otros tipos de cáncer**

30 Prioridad:

**15.07.2015 GB 201512369
15.07.2015 US 201562192670 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.02.2021

73 Titular/es:

**IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 15
72076 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHUSTER, HEIKO;
PEPER, JANET;
WAGNER, PHILIPP y
RAMMENSEE, HANS-GEORG**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 807 832 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos péptidos y nuevas combinaciones de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el cáncer epitelial de ovario y otros tipos de cáncer

5 La presente invención se refiere a un péptido, proteínas, ácidos nucleicos y células destinados a la utilización en métodos inmunoterapéuticos. En particular, la presente invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención se refiere asimismo a un epítipo peptídico para linfocitos T asociado a tumores, solo o en combinación con otros péptidos asociados a tumores que, por ejemplo, puede servir como principio activo farmacéutico en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales, o a estimular *ex vivo* linfocitos T que después serán transferidos a los pacientes. Los péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), o los péptidos como tales, también pueden ser dianas de anticuerpos, de receptores de linfocitos T solubles, y de otras moléculas de unión.

10 La presente invención se refiere a una secuencia peptídica derivada de moléculas HLA de la clase I procedentes de células tumorales humanas que pueden ser utilizadas en composiciones vacunales para desencadenar respuestas inmunitarias antitumorales o como dianas para el desarrollo de compuestos y células farmacéutica o inmunológicamente activos.

Antecedentes de la invención

20 El cáncer epitelial de ovario (CEO) sigue siendo la neoplasia maligna ginecológica más mortífera y la quinta causa de muerte por cáncer en el mundo occidental, responsable de unos 22.000 diagnósticos nuevos y 14.000 fallecimientos solo en EE. UU. durante el año 2014 (1). El único tratamiento curativo disponible consiste en la resección completa del tumor en un estadio inicial sin metástasis. Por desgracia, la mayoría de las pacientes (más del 70%) son diagnosticadas cuando el tumor ya se halla en estadio III o IV debido a la ausencia de síntomas iniciales que sean específicos. A pesar de los avances en la quimioterapia y la reciente aprobación del bevacizumab como tratamiento de primera línea, la mayoría de las afectadas presentan recidivas pocos meses o años después de recibir el tratamiento inicial (2, 3).

25 A la vista de los graves efectos secundarios y del coste que comporta el tratamiento del cáncer, existe la necesidad de descubrir factores que puedan ser usados para el tratamiento del cáncer en general y, en particular, del cáncer de ovario.

30 La inmunoterapia antitumoral representa una opción de tratamiento dirigido contra las células cancerosas que reduce los efectos secundarios. La inmunoterapia antitumoral aprovecha la existencia de los antígenos asociados a tumores. La clasificación actual de los antígenos asociados a tumores (TAA) comprende los siguientes grupos principales:

35 a) Antígenos cáncer-testículo: Los primeros TAA descubiertos que pueden ser reconocidos por linfocitos T pertenecen a esta clase, que inicialmente se denominó antígenos cáncer-testículo (CT) porque sus miembros se expresan en tumores humanos histológicamente diferentes y en los tejidos normales solo se encuentran en los espermatozoides/espermatogonias del testículo y ocasionalmente en la placenta. Como las células del testículo no expresan moléculas HLA de clase I y II, estos antígenos no pueden ser reconocidos por los linfocitos T de los tejidos normales y, por tanto, se consideran como específicos de tumor desde el punto de vista inmunológico. Ejemplos conocidos de antígenos CT son los miembros de la familia MAGE y el NY-ESO-1.

40 b) Antígenos de diferenciación: Estos TAA son compartidos por los tumores y por el tejido normal del que deriva el tumor. La mayoría de los antígenos de diferenciación conocidos se halla en los melanomas y en los melanocitos normales. Muchas de esas proteínas relacionadas con el linaje melanocítico participan en la biosíntesis de la melanina y no son específicas de tumor, lo que no impide que sean muy utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer. Algunos ejemplos son la tirosinasa y Melan-AMART-1 en el melanoma y el PSA en el cáncer de próstata.

45 c) TAA sobreexpresados: Se han detectado genes que codifican TAA de amplia expresión en tumores histológicamente distintos y en numerosos tejidos normales, en general con niveles de expresión más bajos. Es posible que muchos de los epítipos procesados y posiblemente presentados por los tejidos normales lo sean por debajo del límite necesario para ser reconocidos por los linfocitos T, pero que la sobreexpresión por parte de las células tumorales rompa la tolerancia vigente hasta ese momento y desencadene la respuesta antitumoral. Ejemplos destacados de esta clase de TAA son Her-2/neu, survivina, telomerasa o WT1.

50 d) Antígenos específicos de tumor: Estos TAA únicos son fruto de mutaciones de genes normales (como β -catenina, CDK4, etc.) Algunos de esos cambios moleculares están relacionados con la transformación neoplásica y/o su progresión. Los antígenos específicos de tumor generalmente son capaces de inducir potentes respuestas inmunitarias sin riesgo de reacciones autoinmunitarias contra los tejidos normales. Por otro lado, casi siempre estos TAA solo son relevantes para el mismo tumor exacto en el que fueron identificados y normalmente no se encuentran en muchos otros tumores de su tipo. La especificidad (o asociación) tumoral de un péptido también puede surgir si el péptido procede de un exón del (asociado con) tumor en el caso de proteínas con isoformas específicas de tumor (asociadas con el mismo).

55 e) TAA resultantes de modificaciones postraduccionales anormales: Estos TAA pueden surgir a partir de

proteínas que no son específicas ni se sobreexpresan en los tumores, pese a lo cual aparecen asociados a tumores por procesos postraduccionales que se activan principalmente en los tumores. Ejemplos de este tipo surgen a raíz de patrones de glucosilación alterados que generan epítomos nuevos en tumores, tal y como sucede con MUC1, o de fenómenos como el ajuste de proteínas durante la degradación, que en algunos casos pueden ser específicos de tumor.

f) Proteínas de oncovirus: Estos TAA son proteínas virales que podrían desempeñar un papel crítico en el proceso oncogénico y que, como extrañas a causa de su origen no humano, pueden desencadenar una respuesta de los linfocitos T. Ejemplos de tales proteínas son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano de tipo 16, que se expresan en el carcinoma de cuello uterino.

En el transcurso de las dos últimas décadas, a raíz de diversos hallazgos clínicos el cáncer epitelial de ovario ha sido reconocido como un tumor altamente inmunógeno. Al presentar con frecuencia infiltración de células inmunitarias, el cáncer epitelial de ovario fue uno de los primeros tipos de cáncer en que se pudo confirmar la relación entre la infiltración de los linfocitos T y el pronóstico clínico. En esa población de linfocitos T infiltrados se han descubierto linfocitos T que son específicos de antígeno y reaccionan contra el tumor. En cambio, la presencia de linfocitos T reguladores (Treg) residentes en el tumor aparece relacionada negativamente con el desenlace clínico. Asimismo, se ha observado que las citocinas inmunoestimuladoras estimulan respuestas antitumorales claras en algunas pacientes.

La eficacia de las estrategias inmunoterapéuticas en el tratamiento contra el cáncer queda patente por el desarrollo y la aprobación en fecha reciente de los inhibidores de los puntos de control inmunitarios como tratamiento contra el melanoma. Es más, la vacunación con péptidos específicos de antígeno y la transferencia de linfocitos T comienzan a mostrar resultados positivos en el melanoma y en otros tumores inmunogénicos, como, por ejemplo, el carcinoma de células renales. La inmunoterapia personalizada posee incluso potencial curativo y en algunos pacientes ha generado resultados asombrosos.

La inmunoterapia basada en los linfocitos T tiene como diana los epítomos peptídicos procedentes de proteínas específicas del tumor o asociadas al mismo, que son presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los antígenos que son reconocidos por los linfocitos T específicos del tumor, esto es, los epítomos, pueden ser moléculas derivadas de todo tipo de proteínas, tales como enzimas, receptores, factores de transcripción, etc., que son expresadas y que, en comparación con células inalteradas del mismo origen, están reguladas al alza en las células del tumor correspondiente.

Existen dos tipos de moléculas MHC: Las MHC de clase I y las MHC de clase II. Las moléculas MHC de clase I están compuestas por una cadena pesada alfa y una beta-2-microglobulina, y las moléculas de clase II por una cadena alfa y otra beta. Su conformación tridimensional da como resultado una hendidura de unión que interviene en la interacción no covalente con los péptidos.

Las moléculas MHC de clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas. Presentan péptidos procedentes de la proteólisis mayoritariamente de proteínas endógenas, productos ribosómicos defectuosos (DRIP) y péptidos grandes. No obstante, los péptidos derivados de compartimentos endosómicos o de fuentes exógenas también se encuentran con frecuencia ligados a moléculas MHC de clase I. Esta vía no clásica de presentación por la clase I se denomina presentación cruzada en la bibliografía (Brossart and Bevan, 1997; Rock et al., 1990). Las moléculas MHC de clase II, que se encuentran mayoritariamente en las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, presentan principalmente péptidos de proteínas exógenas o transmembrana que son captadas por las APC mediante endocitosis y después procesadas por las mismas.

Los complejos constituidos por péptidos y moléculas MHC de clase I son reconocidos por los linfocitos T CD8-positivos portadores del receptor de linfocito T (TCR) adecuado, mientras que los complejos formados por péptidos y moléculas MHC de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores CD4-positivos portadores del TCR apropiado. Es bien sabido que el TCR, el péptido y el MHC están presentes en una relación estequiométrica de 1:1:1.

Los linfocitos T cooperadores CD4-positivos desempeñan un papel importante en la inducción y en el mantenimiento de respuestas eficaces por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos. La identificación de los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4-positivos derivados de los antígenos asociados a tumor (TAA) reviste gran importancia para el desarrollo de productos farmacéuticos que desencadenen respuestas inmunitarias antitumorales (Gnjatic et al., 2003). Los linfocitos T cooperadores generan en el seno del tumor un entorno de citocinas que es propicio para los linfocitos T citotóxicos (CTL) (Mortara et al., 2006) que atrae a las células efectoras, como por ejemplo los propios CTL, células NK, macrófagos o granulocitos.

En ausencia de inflamación, la expresión de las moléculas MHC de clase II se circunscribe principalmente a las células del sistema inmunitario, en concreto a las células presentadoras de antígeno (APC) especializadas, como por ejemplo monocitos, células derivadas de monocitos, macrófagos y células dendríticas. En pacientes con cáncer se ha descubierto que las células del tumor expresan moléculas MHC de clase II (Dengjel y cols., 2006).

Los péptidos alargados pueden actuar como epítomos activos para las MHC de clase II.

Los linfocitos T cooperadores, activados por epítomos de MHC de clase II, desempeñan un papel importante en la coordinación de la función efectora de los CTL en la inmunidad antitumoral. Los epítomos reconocidos por los linfocitos T cooperadores que desencadenan una respuesta de los linfocitos T cooperadores del tipo TH1 apoyan las funciones efectoras de los linfocitos T citotóxicos CD8-positivos, que incluyen funciones citotóxicas dirigidas contra las células tumorales que muestran en su superficie complejos de MHC/péptido asociado a tumor. De esta forma, los epítomos de los péptidos asociados a tumores que son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, solos o en combinación con otros péptidos asociados a tumores, pueden servir como principios activos farmacéuticos en composiciones vacunales destinadas a estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

En modelos de mamífero como el ratón se ha demostrado que los linfocitos T CD4-positivos pueden inhibir la manifestación de los tumores aun sin el concurso de los linfocitos T CD8-positivos a través de la inhibición de la angiogenia mediante la secreción de interferón gamma (IFN- γ). Existen indicios de que los linfocitos T CD4 actúan directamente como agentes efectores antitumorales (Braumuller et al., 2013; Tran et al., 2014).

Dado que la expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II suele ser exclusiva de las células inmunitarias, la posibilidad de aislar péptidos de clase II directamente de tumores primarios no se consideraba factible. Pero Dengjel y cols. descubrieron varios epítomos de MHC de clase II directamente en tumores (WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1).

Dado que ambos tipos de respuesta, la dependiente de CD8 y la de CD4, contribuyen conjunta y sinérgicamente al efecto antitumoral, la identificación y caracterización de los antígenos asociados a tumor reconocidos por los linfocitos T CD8+ (ligando: moléculas de MHC de clase I + epítomo peptídico) o por los linfocitos T colaboradores CD4+ (ligando: moléculas de MHC de clase II + epítomo peptídico) es importante para el desarrollo de vacunas antitumorales.

Para desencadenar la respuesta inmunitaria celular el péptido de MHC de clase I ha de unirse a una molécula de MHC. Este proceso depende del alelo de la molécula MHC y de los polimorfismos específicos de la secuencia de aminoácidos del péptido. Los péptidos que se unen a las MHC de clase I suelen tener una longitud de 8 a 12 residuos de aminoácidos y suelen contener dos residuos conservados ("anclaje") en su secuencia que interactúan con la hendidura de unión correspondiente de la molécula de MHC. De este modo cada alelo MHC posee un "motivo de unión" que determina qué péptidos se pueden unir específicamente a la hendidura de unión.

En la reacción inmunitaria dependiente de las MHC de clase I, los péptidos no solo tienen que ser capaces de unirse a ciertas moléculas MHC de clase I expresadas por las células tumorales, también tienen que ser reconocidos por linfocitos T portadores de receptores TCR específicos.

Para que las proteínas sean reconocidas por los linfocitos T como antígenos específicos o asociados a tumor y puedan ser empleadas como tratamiento, deben cumplir ciertos prerrequisitos. El antígeno debe ser expresado principalmente por células tumorales y no por tejidos sanos normales o, de hacerlo, debe serlo en cantidades comparativamente pequeñas. En una forma de realización preferida, el péptido debe ser presentado en exceso por las células tumorales con respecto a los tejidos sanos normales. Y no solo es conveniente que el antígeno de interés esté presente únicamente en un tipo de tumor, sino que lo esté también en altas concentraciones (número de copias del péptido por célula). Los antígenos específicos de tumor y asociados a tumor proceden a menudo de proteínas que intervienen directamente en la transformación de una célula normal en una tumoral a causa de su función, por ejemplo porque intervienen en el control del ciclo celular o en la supresión de la apoptosis. Además, también las dianas ulteriores de las proteínas que son las causantes directas de la transformación pueden estar reguladas al alza y, por tanto, estar asociadas indirectamente al tumor. Tales antígenos asociados indirectamente a los tumores también pueden ser las dianas para una estrategia de vacunación (Singh-Jasuja et al., 2004). En ambos casos es esencial que la secuencia de aminoácidos del antígeno contenga epítomos, puesto que el péptido («péptido inmunogénico») derivado de un antígeno asociado a tumor debe desencadenar una respuesta de los linfocitos T en condiciones *in vitro* o *in vivo*.

Básicamente, cualquier péptido capaz de unirse a una molécula de MHC puede actuar como un epítomo de linfocito T. Un prerrequisito para la inducción de una respuesta de linfocitos T *in vitro* o *in vivo* es la presencia de un linfocito T dotado del correspondiente TCR y la ausencia de tolerancia inmunitaria hacia ese epítomo en particular.

Por consiguiente, los TAA son un punto de partida para el desarrollo de una terapia basada en linfocitos T incluidas, entre otras, las vacunas antitumorales. Los métodos para identificar y caracterizar los TAA están basados en el uso de linfocitos T que pueden aislarse de pacientes o de individuos sanos, o están basados en la generación de perfiles de transcripción diferenciales o patrones de expresión peptídica diferenciales entre los tumores y los tejidos normales. No obstante, la identificación de genes sobreexpresados o expresados selectivamente en tejidos tumorales o en estirpes de células tumorales humanas no aporta información precisa acerca del uso de los antígenos transcritos de esos genes en la inmunoterapia. Ello se explica porque solo una subpoblación individual de epítomos de esos antígenos resulta adecuada para aplicaciones de ese tipo, puesto que ha de haber un linfocito T con el TCR correspondiente y la inmunotolerancia hacia ese epítomo concreto ha de ser mínima o nula. Por tanto, en una forma de realización muy preferida de la invención es importante seleccionar únicamente aquellos péptidos que sean presentados en exceso o de forma selectiva contra los cuales se encuentre un linfocito T funcional y/o

proliferativo. Un linfocito T funcional se define como un linfocito T que tras la estimulación con un antígeno específico puede sufrir una expansión clonal y ser capaz de ejecutar funciones efectoras («linfocito T efector»).

5 Peruzzi et al. (en Peruzzi, D., et al., MMP11: A Novel Target Antigen for Cancer Immunotherapy. Clin Cancer Res June 15 2009 (15) (12) 4104-4113) dan a conocer un péptido (TUMAP) de antígeno asociado a tumor (TAA) consistente en la secuencia de aminoácidos 237-YTFRYPLSL-245, derivada de la MMP-11 (estromalislina-3).

En el caso de dirigir la acción contra complejos péptido-MHC a través de TCR específicos (p. ej., TCR solubles) y de los anticuerpos acordes con la invención, la inmunogenicidad de los péptidos subyacentes es secundaria. En tales casos, la presentación es el factor determinante.

Resumen de la invención

10 En un primer aspecto de la presente invención, ésta se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 82, o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Las tablas siguientes muestran los péptidos dados a conocer, sus respectivas SEQ ID N.º, y los probables genes originarios (subyacentes) de tales péptidos. La SEQ ID N.º 82 es acorde con la invención. Todos los péptidos de la Tabla 1 y la Tabla 2 se unen a los alelos HLA-A*02. Los péptidos de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Tabla 2 han sido dados a conocer con anterioridad en grandes listados resultantes del cribado genético ultrarrápido con elevadas tasas de error o son el resultado del cálculo con algoritmos, pero no habían sido vinculados en absoluto con el cáncer hasta ahora. Los péptidos de la Tabla 3 son péptidos adicionales que podrían ser útiles si se combinan con los demás péptidos dados a conocer. Los péptidos de la Tabla 4 son además útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento de otros tipos de neoplasias malignas en las que interviene una sobreexpresión o una presentación en exceso del respectivo polipéptido originario.

20

Tabla 1: Péptidos dados a conocer; X = S, R o G

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen	Unión a HLA
1	QFITSTNTF	MUC16	A*24:02
2	STETSTVLY	MUC16	A*01
3	AHSKITTAM	MUC16	B*39:01
4	AVKTETSTSER	MUC16	A*31:01
5	AVTNVRTSI	MUC16	B*13
6	DALTPLVTI	MUC16	B*5101
7	DALVLKTV	MUC16	B*51
8	DPYKATSAV	MUC16	B*51
9	EPETTTSFITY	MUC16	B*35
10	ERSPVIQTL	MUC16	B*39:01
11	ETILTFHAF	MUC16	A*25
12	EVISSRGTSM	MUC16	A*25
13	EVITSSRTTI	MUC16	A*25
14	EVTSSGRTSI	MUC16	A*25
15	FPEKTTHSF	MUC16	B*35
16	FPHSEETTM	MUC16	B*35
17	FPHSEITTL	MUC16	B*35
18	FQRQGQTAL	MUC16	B*15:01
19	GDVPRPSSL	MUC16	B*08:01
20	GHESHSPAL	MUC16	B*39:01

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen	Unión a HLA
21	GHTTVSTSM	MUC16	B*39:01
22	GTHSPVTQR	MUC16	A*31:01
23	GTSGTPVSK	MUC16	A*11
24	HPDPQSPGL	MUC16	B*35
25	IPRVFTSSI	MUC16	B*51
26	ISDEVVTRL	MUC16	C*05
27	ISIGTIPRI	MUC16	B*15:17
28	ISKEDVTSI	MUC16	B*15:17
29	ITETSAVLY	MUC16	A*01
30	ITRLPTSSI	MUC16	B*15:17
31	KDTAHTeam	MUC16	B*44:02
32	KEDSTALVM	MUC16	B*40/B*44
33	KEVTSSSSVL	MUC16	B*40/B*44/?
34	LPHSEITTL	MUC16	B*35
35	LTISTHKTI	MUC16	B*15:17
36	LTKSEERTI	MUC16	B*15:17
37	RDSLYVNGF	MUC16	B*44:02
38	RETSTSQKI	MUC16	B*18:01
39	RSSGVTFSR	MUC16	A*31:01
40	SAFESHSTV	MUC16	B*51
41	SATERSASL	MUC16	C*03/?
42	SENSETTAL	MUC16	B*40/B*44/?
43	SEQRTSPSL	MUC16	?
44	SESPSTIKL	MUC16	B*40/?
45	SPAGEAHSL	MUC16	B*07/B*56
46	SPAGEAHSLLA	MUC16	B*56:01
47	SPHPVSTTF	MUC16	B*07:02
48	SPHPVTALL	MUC16	B*07:02
49	SPLFQRSSL	MUC16	B*0702
50	SPQNLRNLT	MUC16	B*35/B*07:02
51	SPRLNTQGNTAL	MUC16	B*07:02
52	SPSEAITRL	MUC16	B*07:02
53	SPSKAFASL	MUC16	B*35/B*07:02

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen	Unión a HLA
54	SPSSPTPKV	MUC16	B*07:02
55	SPSSQAPVL	MUC16	B*07:02
56	SQGFSHSQM	MUC16	B*15:01
57	SRTEVISSR	MUC16	B*27
58	SSAVSTTTI	MUC16	B*15:17
59	SSPLRVTSL	MUC16	n/a
60	STASSLSK	MUC16	A*11
61	STQRVTTSM	MUC16	B*07?
62	STSQEIHSA TK	MUC16	A*11
63	SVLADLVTTK	MUC16	A*03:01
64	SVPDILSTSW	MUC16	A*24:02
65	TAGPTTHQF	MUC16	C*03
66	TEISSR TSI	MUC16	B*49:01
67	TENTGKEKL	MUC16	B*40/B*44
68	TET EAIHVF	MUC16	B*18
69	TEVSRTEVI	MUC16	B*49:01
70	TExVLQGLL	MUC16	B*40/B*44/?
71	TPGGTRQSL	MUC16	B*07:02/B*35
72	TPGNRAISL	MUC16	B*07:02/B*35
73	TPNSRGETSL	MUC16	B*07:02
74	TSGPVTEKY	MUC16	B*35
75	TSPAGEAHSL	MUC16	?
76	VHESHSSVL	MUC16	B*39:01
77	VPRSAATTL	MUC16	B*07:02/B*35
78	VTSAPGRSI	MUC16	B*15:17
79	VTSSR TSI	MUC16	B*15:17
80	YPDPSKASSAM	MUC16	B*35
81	AAWLR SAAA	MMP11	B*55/B*56
82	APA A WLR SAA	MMP11	B*55/B*56
83	APA A WLR SAAA	MMP11	B*55/B*56
84	LPSPV DAAF	MMP11	B*35
85	RGVPSEIDAAF	MMP11	B*58
86	EAGPPAFYR	ESR1	A*66

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen	Unión a HLA
87	STSSHSLQK	ESR1	A*03/A*11
88	APHLHLSA	KLK10	B*56:01
89	APHLHLSAA	KLK10	B*56:01
90	RALAKLLPL	KLK10	B*08/A*02
91	SAASGARAL	KLK10	C*03
92	VLVDQSWVL	KLK10	A*02
93	DYLKRFYLY	MMP7	A*24
94	SETKNANSL	MMP7	B*44/B*41/B*40
95	SSDPNAVMY	MMP7	A*01
96	YFPDGPNTL	MMP7	B*35
97	YFPDGPNTLAH	MMP7	B*35
98	NEIERVFWW	EYA2	B*44:02
99	NVGGLIGTPK	EYA2	A*03
100	RVKEMYNTY	EYA2	A*30/A*32
101	SAPLRVSQL	EYA2	?
102	DTDEYVLKY	EFHC1	A*01
103	KDSTKTAF	EFHC1	B*44
104	SKAPVLTLY	EFHC1	B*15:03
105	AEYTDVLQKI	EPS8L1	B*49
106	EYTDVLQKI	EPS8L1	A*24
107	RPHLTSDA	EPS8L1	B*56
108	RPHLTSDAV	EPS8L1	B*56
109	RPHLTSDAVA	EPS8L1	B*56
110	SAKSIYEQR	EPS8L1	A*31
111	SPEEGARVY	EPS8L1	B*35
112	SQYPVNHLV	EPS8L1	B*15
113	YPVNHLVTF	EPS8L1	B*35
114	AAASAIKVI	IDO1	C*12
115	IHDHVNPKAFF	IDO1	B*38
116	NPKAFFSVL	IDO1	B*07
117	NPSVREFVL	IDO1	B*35
118	RSYHLQIVTK	IDO1	A*11/A*03
119	RYMPPAHRNF	IDO1	A*24

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen	Unión a HLA
120	TEFEQYLHF	SOX17	B*18/B*44
121	VSDASSAVYY	SOX17	A*01
122	AEIEADRSY	LAMC2	B*44
123	AQKVDTRAK	LAMC2	A*03
124	HPSAHDVIL	LAMC2	B*35:03
125	RIKQKADSL	LAMC2	B*08
126	SEGASRSLGL	LAMC2	B*37
127	SVDEEGLVLL	LAMC2	A*02
128	SVHKITSTF	LAMC2	A*25
129	TREATQAEI	LAMC2	B*39
130	VYFVAPAKF	LAMC2	A*24
131	APQSAHAAF	SGPL1	B*07
132	ETIIIFHSL	EYA3	A*25
133	TELLVKAY	SGPL1	B*18
134	WQEGRASGTVY	SGPL1	B*15
135	IRSENFEEEL	CRABP2	B*39
136	KIAVAAASK	CRABP2	A*03
137	NVMLRKiAV	CRABP2	B*08
138	RELTNDGELIL	CRABP2	B*40/B*44
139	VAAASKPAV	CRABP2	?
140	SPNAIFKAL	SOX9	B*07
141	SSKNKPHVKR	SOX9	A*31
142	TPASAGHVW	SOX9	B*07
143	YTDHQNSSSY	SOX9	A*01
144	AEVLLPRL	MSLN	B*40
145	AVLPLTVAEVQK	MSLN	A*03
146	LPTARPLL	MSLN	B*07
147	RVRELAVAL	MSLN	A*02
148	NLPIFLPRV	MLPH	A*02
149	RVHPPEEQGW	MLPH	B*58
150	TVKPSGKPR	MLPH	A*31
151	YYEHVKARF	MLPH	A*24
152	AARPAGATL	ERBB2	B*07

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Gen	Unión a HLA
153	MPNPEGRYTF	ERBB2	B*35
154	FYIKTSTTV	CRABP2	A*24
155	RTTEINFKV	CRABP2	A*02
156	YIKTSTTV	CRABP2	B*08
157	GQAAQGPTI	DDR1	B*15
158	HRFLAEDAL	DDR1	B*39:01
159	EEVARFYAA	FOLR1	B*45
160	NPNEEVARF	FOLR1	B*35
161	NPNEEVARFY	FOLR1	B*35
162	KSQTLLGK	ULK1	A*11/A*03
163	DELISKSF	YPEL1	B*18
164	HDELISKSF	YPEL1	B*35
165	GRAYLFNSV	YPEL1	B*27
166	YLFNSVNV	YPEL1	A*02
167	APDNRPAL	MUC1	B*07/B*35
168	HHSPTPTTL	MUC1	B*38/B*39
169	HPMSEPTY	MUC1	B*35
170	LQRDISEM	MUC1	B*51
171	LQRDISEMF	MUC1	B*51
172	AIAEIGNQL	MMP9	A*02
173	DVAQVTGALR	MMP9	A*68
174	SEDLPRAVI	MMP9	B*49/B*40
175	APDAKSFVL	LGALS1	B*35
176	EVAPDAKSF	LGALS1	A*25
177	FPFQPGSVAEV	LGALS1	B*35
178	GEVAPDAKSFVL	LGALS1	B*40
179	LPDGYEFKF	LGALS1	B*35

Tabla 2: Péptidos adicionales acordes con la presente invención sin previa relación conocida con el cáncer. X = S, R o G.

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
180	DKAFTAATTEVSR	II	MUC16
181	ELGPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
182	ELGPYTLDRNSLYVNG	II	MUC16

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
183	FDKAFTAATTEVSR	II	MUC16
184	GPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
185	LGPYTLDRDLSLYVN	II	MUC16
186	LGPYTLDRNSLYVN	II	MUC16
187	LGPYTLDRNSLYVNG	II	MUC16
188	STETITRLSTFPFVTG	II	MUC16
189	ELQWEQAQDYLYKR	II	MMP7
190	ELQWEQAQDYLYKRF	II	MMP7
191	GINFLYAATHELGH	II	MMP7
192	LQWEQAQDYLYKR	II	MMP7
193	LQWEQAQDYLYKRF	II	MMP7
194	SELQWEQAQDYLYKR	II	MMP7
195	SELQWEQAQDYLYKRF	II	MMP7
196	VPYNILTPYPGPR	II	EPS8L1
197	YVPYNILTPYPGPR	II	EPS8L1
198	GNWKIIRSENFEEL	II	CRABP2
199	GNWKIIRSENFEELLK	II	CRABP2
200	NWKIIRSENFEEL	II	CRABP2
201	PNFSGNWKIIRSENF	II	CRABP2
202	VMLRKIAVAAASKPA	II	CRABP2
203	WKIIRSENFEEL	II	CRABP2
204	LQRYSSDPTGALT	II	EGFR
205	NPTTYQMDVNPEGK	II	EGFR
206	NPTTYQMDVNPEGKY	II	EGFR
207	DDGGQFVVTNPVNNDG	II	CDH1
208	DKEGKVFYSITGQGADTPP	II	CDH1
209	DKEGKVFYSITGQGADTPPV	II	CDH1
210	DKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
211	DKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
212	DPELPDKNMFTINRNTG	II	CDH1
213	DPELPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
214	DPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
215	DPELPDKNMFTINRNTGVISV	II	CDH1

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
216	DPELPDKNMFTINRNTGVISVV	II	CDH1
217	DPELPDKNMFTINRNTGVISVVT	II	CDH1
218	DVNTYNAAIAYTILS	II	CDH1
219	DVNTYNAAIAYTILSQ	II	CDH1
220	EGKVFYSITGQGADT	II	CDH1
221	EGKVFYSITGQGADTPP	II	CDH1
222	EGKVFYSITGQGADTPPV	II	CDH1
223	ELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
224	GGQFVVTTPVNN	II	CDH1
225	GKVFYSITGQGADT	II	CDH1
226	GPFKLVQIKSNKDK	II	CDH1
227	GPFKLVQIKSNKDKE	II	CDH1
228	GPFKLVQIKSNKDKEGK	II	CDH1
229	KNMFTINRNTGVI	II	CDH1
230	KNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
231	LPDKNMFTINRNTG	II	CDH1
232	LPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
233	LPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
234	PELPDKNMFTINRNTGVI	II	CDH1
235	PELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
236	QPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
237	SQPELPDKNMFTINRNTGVIS	II	CDH1
238	SQPELPDKNMFTINRNTGVISVVT	II	CDH1
239	SVPRYLPRPANPDE	II	CDH1
240	TDGVITVKRPLRFHNPQ	II	CDH1
241	TRALDREDFEHVK	II	CDH1
242	VPRYLPRPANPDE	II	CDH1
243	ALEFRALEPQGLL	II	AGRN
244	ALEFRALEPQGLLL	II	AGRN
245	DTRIFFVNPAPPY	II	AGRN
246	DTRIFFVNPAPPYL	II	AGRN
247	DTRIFFVNPAPPYLW	II	AGRN
248	DTRIFFVNPAPPYLWP	II	AGRN

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
249	DTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
250	EFRALEPQGLLL	II	AGRN
251	GAPVPAFEGRSFLAFPTL	II	AGRN
252	GDTRIFFVNPAPPYLWP	II	AGRN
253	GDTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
254	IVDVHFDPTTAFRAPD	II	AGRN
255	KVRVWRYLK GKDLVAR	II	AGRN
256	LALEFRALEPQGLLL	II	AGRN
257	LEFRALEPQGLLL	II	AGRN
258	SGPFLADFNFSH	II	AGRN
259	TGDTRIFFVNPAPPYLWPA	II	AGRN
260	TRIFFVNPAPPYL	II	AGRN
261	VDVHFDPTTAFRAPD	II	AGRN
262	VDVHFDPTTAFRAPDV	II	AGRN
263	VRVWRYLK GKDLVAR	II	AGRN
264	APVPAFEGRSFLAFPT	II	AGRN
265	APVPAFEGRSFLAFPTL	II	AGRN
266	ALRGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
267	DLPGRFVAESA EVLLP	II	MSLN
268	DLPGRFVAESA EVLLPR	II	MSLN
269	GQPIIRSIPQGIV	II	MSLN
270	GQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
271	LGQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
272	LPAALACWGV RGSL	II	MSLN
273	LPGRFVAESA EVLL	II	MSLN
274	LPGRFVAESA EVLLP	II	MSLN
275	LPGRFVAESA EVLLPR	II	MSLN
276	LRGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
277	PGRFVAESA EVLLPR	II	MSLN
278	PGRFVAESA EVLLPRL	II	MSLN
279	QPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
280	RGLLPVLGQPIIR	II	MSLN
281	SRTLGETGQE AAPL	II	MSLN

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
282	STERVRELAVALAQK	II	MSLN
283	TDAVLPLTVAEVQ	II	MSLN
284	VAEVQKLLGPHVEG	II	MSLN
285	VAEVQKLLGPHVEGLK	II	MSLN
286	VLGQPIIRSIPQGIVA	II	MSLN
287	VRGSLLEADVRLG	II	MSLN
288	VRGSLLEADVRLGG	II	MSLN
289	LPAALACWGVRSLL	II	MSLN
290	AIKVLRENTSPKANKE	II	ERBB2
291	DPSPLQRYSEDPTVPLPS	II	ERBB2
292	DPSPLQRYSEDPTVPLPSE	II	ERBB2
293	ELVSEFSRMARD	II	ERBB2
294	ELVSEFSRMARDPQ	II	ERBB2
295	IPVAIKVLRENTSPKANKE	II	ERBB2
296	RRLQETELVEPLTPS	II	ERBB2
297	SPQPEYVNQPDVRPQPP	II	ERBB2
298	VKPDLSYMPIWKFPDE	II	ERBB2
299	ASGMRYLATLNFVHR	II	DDR1
300	IASGMRYLATLNFVHR	II	DDR1
301	KEVKIMSRLKDPN	II	DDR1
302	LNQFLSAHQLEDK	II	DDR1
303	NPAYRLLLATYARPP	II	DDR1
304	NPAYRLLLATYARPPR	II	DDR1
305	SNPAYRLLLATYARPP	II	DDR1
306	SNPAYRLLLATYARPPR	II	DDR1
307	DPSTDYYQELQRDISE	II	MUC1
308	VETQFNQYKTEAASR	II	MUC1
309	GRQVWVYTGASVLGPR	II	MMP9
310	NQLYLFDGKYWRFSEG	II	MMP9
311	RQVWVYTGASVLGPR	II	MMP9
312	SGRQVWVYTGASVLG	II	MMP9
313	SGRQVWVYTGASVLGP	II	MMP9
314	SGRQVWVYTGASVLGPR	II	MMP9

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
315	VDPRSASEVDRMFPG	II	MMP9
316	GEVAPDAKSFVLN	II	LGALS1
317	LTVKLPDGYEFKFPNRLNL	II	LGALS1
318	VRGEVAPDAKSFVLN	II	LGALS1
319	VRGEVAPDAKSFVLNLG	II	LGALS1

Tabla 3: Péptidos adicionales para el tratamiento contra el cáncer. X = S, R o G

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
320	ATSKIPLAL	I	MUC16
321	ITSSRTTI	I	MUC16
322	LNFTITNLQ	I	MUC16
323	TATSPMVPAS	I	MUC16
324	TTLPESRPS	I	MUC16
325	VELRVLALP	I	LRFN4
326	AEDNLIHKF	I	NLRP2
327	REDLERLGV	I	NLRP7
328	DTKDPAVTEW	I	TLR7
329	ILISKLLGA	I	TLR7
330	SESLRTLEF	I	TLR7
331	VLAELVAKL	I	TLR7
332	INTSILLIF	I	TLR3
333	ALQPLLHTV	I	IL17RD
334	RLMDNLPQL	I	IL17RD
335	LIISPTREL	I	DDX10
336	ADSKVLLF	I	WDR35
337	DSLLEQANNAI	I	WDR35
338	DYQGIKFKR	I	WDR35
339	EVVGYFGRF	I	WDR35
340	KYVKGLISI	I	WDR35
341	SIGTPLDPK	I	WDR35
342	TASDKILIV	I	WDR35
343	GVIKVISGF	I	NOC3L
344	KVKLENKLIK	I	NOC3L

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
345	SSSEPVHAK	I	NOC3L
346	SSSEPVHAKK	I	NOC3L
347	LSDQLAQAI	I	DNASE1
348	LSDIVIEKY	I	WDR27
349	SLDDHVAV	I	WDR27
350	SQIDQQNSV	I	LRIF1
351	STIDPSGTRSK	I	LRIF1
352	VFRDQEPKI	I	LRIF1
353	VLREKEAAL	I	LRIF1
354	TRLQQAQAL	I	POLR2J3
355	VAAPEHISY	I	POLR2J3
356	NSKKKVAL	I	DDX52
357	QNSKKKVAL	I	DDX52
358	RDNTVHSF	I	DDX52
359	KQVSEFMTW	I	RASGEF1B
360	KTKPQSIQR	I	RASGEF1B
361	THIELERL	I	RASGEF1B
362	IAPKILQL	I	RASGEF1B
363	DIASVSGRW	I	BICC1
364	KPKQPSKSV	I	BICC1
365	MPAETIKEL	I	BICC1
366	SAVKEGTAM	I	BICC1
367	EEEKLQAAF	I	COMMD10
368	DEFNLQKM	I	EMC1
369	DEYKVTAFA	I	EMC1
370	ETNIGGLNW	I	EMC1
371	FPQTALVSF	I	EMC1
372	GEFGKKADGLL	I	EMC1
373	GSMGSFSEK	I	EMC1
374	IFLIDGVTGRI	I	EMC1
375	IPPEVQRI	I	EMC1
376	IPYSPDVQI	I	EMC1
377	QVAPPVLKR	I	EMC1

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
378	TEKNVIAAL	I	EMC1
379	VGKVKFASL	I	EMC1
380	VPFSHVNI	I	EMC1
381	VVYQYWNTK	I	EMC1
382	YPSKQFDVL	I	EMC1
383	AADDSADKV	I	ZNF217
384	HHKEKQTDV	I	ZNF217
385	KQTDVAAEV	I	ZNF217
386	KSAFPAQSK	I	ZNF217
387	NEVVQVHAA	I	ZNF217
388	SEDLNKHVL	I	ZNF217
389	GETIHIPTM	I	BCAT1
390	GPKLASRIL	I	BCAT1
391	GVKKPTKAL	I	BCAT1
392	KEKDPNNL	I	BCAT1
393	KVSERYLTM	I	BCAT1
394	LPVFDKEEL	I	BCAT1
395	LSKLTDIQY	I	BCAT1
396	DLSNIINKL	I	WDR12
397	RVWDVESGSLK	I	WDR12
398	SPTTSHVGA	I	WDR12
399	VEIEYVEKY	I	WDR12
400	VERNKVKAL	I	WDR12
401	REAVSKEDL	I	PANK2
402	IMGGNSILHSA	I	STXBP6
403	KQFEGSTSF	I	STXBP6
404	EEFLRQEHF	I	OASL
405	ETIPSEIQVF	I	OASL
406	EVGEALKTVL	I	DMD
407	KLEDLEEQL	I	DMD
408	LKIQSIAL	I	DMD
409	MNVLTEWLAAT	I	DMD
410	AIQDKLFQV	I	CHCHD6

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
411	FPNFDKQEL	I	SMARCAD1
412	GQTKEVLVI	I	SMARCAD1
413	KLIESTSTM	I	SMARCAD1
414	KPYQKVGL	I	SMARCAD1
415	KQESIVLKL	I	SMARCAD1
416	NANNRLLL	I	SMARCAD1
417	SEVPNGKEV	I	SMARCAD1
418	TNNIGSIAR	I	PANK2
419	DAKGRTVSL	I	GPX8
420	IIKKKEDL	I	GPX8
421	DVIDVVQAL	I	C20orf194
422	EEFKITSF	I	C20orf194
423	SDFEKTGF	I	C20orf194
424	DEDRLLVVF	I	USP34
425	HHSNIPMSL	I	USP34
426	LFPSLIKNL	I	USP34
427	NTNIPIGNK	I	USP34
428	SDQVADLR	I	USP34
429	THFSFPLRL	I	USP34
430	TYDSVTDKF	I	USP34
431	AESLYEIRF	I	TM9SF1
432	DEFLGLTHTY	I	TM9SF1
547	IITEVITRL	I	MUC16
548	KMISAIPTL	I	MUC16
549	TYSEKTLF	I	MUC16

Tabla 4: Péptidos adicionales útiles para el tratamiento contra el cáncer. X = S, R o G

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
433	ALDFFGNGPPVNY	II	IFI30
434	ALDFFGNGPPVNYKT	II	IFI30
435	DFFGNGPPVNYK	II	IFI30
436	DFFGNGPPVNYKT	II	IFI30
437	DFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
438	DFFGNGPPVNYKTGNL	II	IFI30
439	DFFGNGPPVNYKTGNLY	II	IFI30
440	LQALDFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
441	QALDFFGNGPPVNYK	II	IFI30
442	QPPHEYVPWVTVNGKP	II	IFI30
443	SPLQALDFFGNGPPVNYKTG	II	IFI30
444	SPLQALDFFGNGPPVNYKTGN	II	IFI30
445	SPLQALDFFGNGPPVNYKTGNLY	II	IFI30
446	GPPFSSSQSIPVVPR	II	GPR64
447	LPSSLMNNLPAHDM	II	GPR64
448	LPSSLMNNLPAHDME	II	GPR64
449	LPSSLMNNLPAHDMEL	II	GPR64
450	SPIGEIQPLSPQPSAPI	II	GPR64
451	DEVTQPFVIDEKTAEIR	II	PCDHB5
452	KYPELVLDKALDREER	II	PCDHB5
453	KYPELVLDKALDREERPE	II	PCDHB5
454	VTQPFVIDEKTAEIR	II	PCDHB5
455	DGRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
456	DGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
457	DKPILSLGGKPLVG	II	FNDC1
458	GDGRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
459	GDGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
460	GGDGRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
461	GGDGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
462	GRTIVDLEGTPVVSPD	II	FNDC1
463	KVKEYILSYAPALKPF	II	FNDC1
464	KVKEYILSYAPALKPFG	II	FNDC1
465	LGGDGRTIVDLEGTPVVSPDG	II	FNDC1
466	RTHEIKKLASESVYV	II	FNDC1
467	VKEYILSYAPALKPF	II	FNDC1
468	YSKTQYNQVPSEDFERTPQ	II	CXADR
469	AAPNLSRMGAIPVMIP	II	CXADR
470	AAPNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
471	APNLSRMGAIPVMIP	II	CXADR
472	APNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
473	GYSKTQYNQVPSSEDFERTPQ	II	CXADR
474	SKTQYNQVPSSEDFER	II	CXADR
475	SKTQYNQVPSSEDFERTP	II	CXADR
476	SKTQYNQVPSSEDFERTPQ	II	CXADR
477	VAAPNLSRMGAIPVMIPA	II	CXADR
478	VIILYSGDKIYD	II	CXADR
479	YSKTQYNQVPSSEDFER	II	CXADR
480	GHLFALRSLDYE	II	PCDHB3
481	AAEPGYLVTKVAVDGD	II	PCDHB3
482	AAEPGYLVTKVAVDGD	II	PCDHB3
483	AAEPGYLVTKVAVDGDSDS	II	PCDHB3
484	AAEPGYLVTKVAVDGDSDG	II	PCDHB3
485	AEPGYLVTKVAVDGD	II	PCDHB3
486	AEPGYLVTKVAVDGD	II	PCDHB3
487	AEPGYLVTKVAVDGDSDS	II	PCDHB3
488	EPGYLVTKVAVDGD	II	PCDHB3
489	EPGYLVTKVAVDGD	II	PCDHB3
490	EPGYLVTKVAVDGDSDS	II	PCDHB3
491	AEPGYLVTKVAVD	II	PCDHB3
492	ADSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
493	ADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
494	DADSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
495	DADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
496	DADSTEFRPNAPVPLVIDM	II	CTPS2
497	DADSTEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
498	DADSTEFRPNAPVPLVIDMPE	II	CTPS2
499	DSTEFRPNAPVPL	II	CTPS2
500	DSTEFRPNAPVPLV	II	CTPS2
501	DSTEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
502	DSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
503	DSTEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2

ES 2 807 832 T3

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
504	DSTEFRPNAPVPLVIDMPE	II	CTPS2
505	KDADSTEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
506	STEFRPNAPVPL	II	CTPS2
507	STEFRPNAPVPLVI	II	CTPS2
508	STEFRPNAPVPLVID	II	CTPS2
509	STEFRPNAPVPLVIDMP	II	CTPS2
510	AGDYTIANARKLIDE	II	RP2
511	ETLERLQEL		DMD
512	ADITYAIEADSESVK	II	FAT1
513	DITYAIEADSESVK	II	FAT1
514	KRDNYQIKVVASDHGE	II	FAT1
515	KRDNYQIKVVASDHGEK	II	FAT1
516	RDESFVIDRQSGRLK	II	FAT1
517	RDNYQIKVVASDHGE	II	FAT1
518	SPSELDLDRDPAYAIVT	II	FAT1
519	TPPQFSSVKVIHVTSPO	II	FAT1
520	VLPDIIQEFPNY	II	FAT1
521	GPQLFHMDPSGTFVQ	II	PSMA5
522	DKNYFEGTGYARVPTQP	II	LAMA3
523	DKNYFEGTGYARVPTQPH	II	LAMA3
524	DSKPLYTPSSSFGVS	II	LAMA3
525	IQRQVKEINSLQSDFT	II	LAMA3
526	KNYFEGTGYARVPT	II	LAMA3
527	KNYFEGTGYARVPTQP	II	LAMA3
528	KNYFEGTGYARVPTQPH	II	LAMA3
529	SPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
530	SPRVVPNESIPIIPD	II	PTPRG
531	SSPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
532	SSPRVVPNESIPIIP	II	PTPRG
533	SSPRVVPNESIPIIPD	II	PTPRG
534	DDKGYTLMHPSLTRPY	II	CACHD1
535	DVGGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
536	GAGYVVTISHTIH	II	CACHD1

(continuación)

SEQ ID N.º	Secuencia	Clase de MHC	Gen
537	GAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
538	GGAGYVVTISHTIH	II	CACHD1
539	GGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
540	VGGAGYVVTISHTIHS	II	CACHD1
541	MTRTFHDLEGNVAVKRDSG	II	ERMP1
542	RTFHDLEGNVAVKR	II	ERMP1
543	RTFHDLEGNVAVKRDSG	II	ERMP1
544	SGTFFPYSSNPANPK	II	ERMP1
545	SGTFFPYSSNPANPKP	II	ERMP1
546	TRTFHDLEGNVAVKR	II	ERMP1

- 5 La presente invención, además, se refiere en general al péptido acorde con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas, como por ejemplo, cáncer de ovario, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, cáncer de colon o recto, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares y otros tumores que presentan una sobreexpresión de una proteína de la cual deriva un péptido acorde con la SEQ ID N.º 82, en particular del cáncer de ovario.
- 10 La presente invención se refiere, además, a péptidos acordes con la presente invención que tienen la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I.
- La presente invención se refiere, además, al péptido acorde con la presente invención, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.
- 15 La presente invención se refiere, además, al péptido acorde a la presente invención, en que dicho péptido es parte de una proteína de fusión, en particular fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II), o fusionado con (o integrado en la secuencia de) un anticuerpo, como por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.
- La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos acordes con la presente invención. La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico acorde con la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.
- 20 La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa un ácido nucleico acorde con la presente invención.
- La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en el tratamiento de enfermedades y en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer.
- 25 La presente invención concierne, además, a anticuerpos específicamente dirigidos contra el péptido acorde con la presente invención o contra complejos formados por dicho péptido con el MHC, así como métodos para fabricarlos.
- La presente invención concierne, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en concreto de TCR solubles (sTCR) y TCR clonados y sintetizados en linfocitos T autólogos o alogénicos, y a métodos para fabricarlos, así como con linfocitos citotóxicos naturales (o células NK) u otro tipo de células que sean portadoras de dichos TCR o reaccionen de forma cruzada con dichos TCR.
- 30 Los anticuerpos y los TCR constituyen formas de realización adicionales del uso inmunoterapéutico del péptido acorde con la presente invención.
- La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión tal y como se ha descrito antes. La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora acorde con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y
- 35

preferiblemente es una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido acorde con la presente invención, el cual comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la presente invención y el aislamiento del péptido de dicha célula hospedadora o de su medio de cultivo.

5 La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención en que el antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o de una célula presentadora de antígeno artificial mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

10 La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 82.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos acorde con la presente invención.

15 Se da a conocer un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos acordes con la presente invención, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T producidos acorde con la presente invención.

20 La presente invención se refiere, además, al uso como medicamento o en la fabricación de un medicamento de cualquier péptido como los descritos, del ácido nucleico acorde con la presente invención, del vector de expresión conforme a la presente invención, de la célula conforme a la presente invención, del linfocito T activado, del receptor de linfocitos T o del anticuerpo o de otras moléculas que se unan al péptido o al complejo péptido-MHC acordes con la presente invención.

Preferiblemente, el medicamento es activo contra el cáncer.

25 Preferiblemente, dicho medicamento servirá como terapia celular, como vacuna o como proteína basada en un TCR soluble o un anticuerpo.

30 La presente invención concierne, además, al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son de cáncer de ovario, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, cáncer de colon o recto, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vías biliares, y preferiblemente de células de cáncer de ovario.

Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo o un TCR soluble para teñir cortes histológicos del tumor con el fin de detectar la presencia de un péptido de interés unido en complejo con un MHC.

35 Opcionalmente el anticuerpo puede estar dotado de otra función efectora, como es un dominio inmunoestimulante o una toxina.

En la siguiente descripción detallada de los productos de expresión subyacentes (polipéptidos) del péptido acorde con la invención se dan a conocer diversas aplicaciones contra otros tipos de cáncer, tanto terapéuticas como diagnósticas.

40 **Descripción detallada de la invención**

La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

50 Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y de destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en la defensa inmunitaria natural contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas del MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

La presente invención se refiere, además, al péptido acorde con la presente invención, en que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos tal y como se describe más adelante.

5 La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión, en particular fusionado con los aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II), o fusionado con (o integrado en la secuencia de) un anticuerpo, como, por ejemplo, un anticuerpo que es específico de las células dendríticas, es decir, que se une a células dendríticas.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica un péptido acorde con la presente invención. La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico acorde con la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

10 La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa y/o que presenta un ácido nucleico acorde con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en medicina.

15 La presente invención se refiere, además, a anticuerpos tal y como se describen más adelante, y a los métodos para fabricarlos. Se prefieren anticuerpos que sean específicos para los péptidos de la presente invención, y/o para los péptidos de la presente invención cuando están unidos a su MHC. Los anticuerpos preferidos pueden ser monoclonales.

20 La presente invención se refiere, además, a receptores de linfocitos T (TCR), en particular a TCR solubles (sTCR) que reconocen el péptido acorde con la invención y/o los complejos péptido-MHC del mismo, y métodos para sintetizarlos.

La presente invención se refiere, además, a anticuerpos que reconozcan el péptido acorde con la invención y/o los complejos péptido-MHC del mismo, y métodos para sintetizarlos.

25 La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión tal y como se ha descrito antes. La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora acorde con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno. La presente invención se refiere, además, a la célula hospedadora acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno es una célula dendrítica.

30 La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido acorde con la presente invención, que comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la presente invención y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

35 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, el cual comprende la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de los linfocitos T con moléculas MHC de clase I humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno durante un periodo de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo dicho antígeno al menos un péptido acorde con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un método en que dicho antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad suficiente de antígeno con la célula presentadora de antígeno.

40 La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 82.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos acorde con la presente invención.

45 Se da a conocer un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos acordes con la presente invención, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T acorde con la presente invención.

50 La presente invención se refiere, además, al uso como medicamento o en el proceso de fabricación de un medicamento de cualquiera de los péptidos descritos, de un ácido nucleico acorde con la presente invención, de un vector de expresión conforme a la presente invención, de una célula conforme a la presente invención, o de un linfocito T activado acorde con la presente invención.

La presente invención concierne, además, al uso conforme a la presente invención, en que dicho medicamento es

una vacuna, una célula, una población de células, como por ejemplo, una estirpe celular, TCR solubles y anticuerpos monoclonales.

La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la presente invención en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

- 5 La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la presente invención, en que dichas células cancerosas son células de cáncer de ovario.

10 La estimulación de una respuesta inmunitaria depende de la presencia de antígenos que sean reconocidos como extraños por el sistema inmunitario del hospedador. El descubrimiento de la existencia de antígenos asociados a tumores ha suscitado la posibilidad de utilizar el sistema inmunitario del hospedador para intervenir sobre el crecimiento de los tumores. Actualmente se están explorando diversos mecanismos para aprovechar las defensas humorales y celulares del sistema inmunitario en la inmunoterapia contra el cáncer.

15 Ciertos elementos de la respuesta inmunitaria celular son capaces de reconocer específicamente y destruir las células tumorales. El aislamiento de linfocitos T entre las células infiltradas en los tumores o en la sangre periférica hace pensar en que tales células desempeñan un papel importante en las defensas inmunitarias naturales contra el cáncer. Los linfocitos T CD8-positivos en particular, que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) portadoras de péptidos que suelen tener de 8 a 10 residuos de aminoácidos derivados de proteínas o de productos ribosómicos defectuosos (DRIPS) localizados en el citosol, desempeñan un importante papel en esta respuesta. Las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA).

20 Los enormes avances acaecidos en el campo de la inmunoterapia oncológica durante los últimos años le han granjeado un amplio reconocimiento (31, 32) como opción potencialmente curativa (33) o alternativa a los tratamientos quimioterápicos convencionales. Diversos artículos demuestran la relevancia de los antígenos tumorales naturales y mutados que son presentados por el HLA como antígenos valiosos que posibilitan la reacción contra el tumor. Así pues, la identificación a gran escala de los antígenos tumorales específicos del cáncer que son presentados por el HLA añade otra pieza importante al rompecabezas que supone entender de qué forma el sistema inmunitario identifica y reconoce las células tumorales.

25 En la presente invención, los inventores se centran en el cáncer epitelial de ovario (CEO) con el objetivo de caracterizar de forma exhaustiva el inmunopeptidoma del CEO y evaluar los antígenos que son presentados por el HLA para determinar su utilidad en aplicaciones médicas. Hasta el momento, en el ámbito del CEO son pocos los antígenos descubiertos que sean presentados por el HLA, por lo que la mayoría de los ensayos clínicos han dependido de antígenos de cáncer-testículo predichos o confirmados que el CEO no presenta necesariamente con frecuencia, un extremo que nuestro análisis ha podido confirmar.

30 Los inventores demuestran la expresión profusa y consistente de moléculas de HLA de clase I en células tumorales de ovario, en concordancia con datos precedentes publicados. Además, los inventores muestran al nivel de una sola célula que el CEO también presenta una fuerte expresión de moléculas HLA-DR. Esa potente expresión se vio subrayada además por la identificación de grandes cantidades de ligandos de MHC de clase II procedentes de tumores ováricos, así como de fracciones altamente enriquecidas con células tumorales.

35 La determinación (*profiling*) del inmunopeptidoma de 34 tumores ováricos y su comparación con más de 85 fuentes benignas de diverso origen reveló varios cientos de antígenos asociados al CEO. Entre los 100 primeros antígenos del CEO que eran presentados por el HLA de clase I que no lo eran en ninguno de los tejidos de nuestro conjunto de datos benignos, MUC16 fue sin duda el más excepcional. Tanto en lo referente al número de ligandos de HLA descubiertos (más de 80) como a la frecuencia de la presentación en la cohorte de pacientes (~80%), este hecho no tiene precedentes entre ninguno de los demás antígenos tumorales y entidades tumorales que los investigadores han estudiado hasta la fecha. Asimismo, los investigadores pudieron establecer que más del 70% de los ligandos de HLA derivados de MUC16 son inmunogénicos y capaces de sensibilizar los linfocitos T de individuos sanos, lo que convierte a la mucina 16 en un antígeno de primera clase sin parangón para la inmunoterapia contra el CEO. La determinación del inmunopeptidoma proporciona, además, una visión de los aparentes entresijos mecanicistas del CEO, que se reflejan en el ligandoma del HLA tanto en lo referente a los ligandos de HLA de clase I como de clase II. Los ligandos de HLA procedían, entre muchas otras fuentes, de importantes fosfatasa y cinasas (DDR1, EYA2), factores de transcripción (SOX9, SOX17) y proteínas asociadas con la inmunodepresión (IDO1, galectina 1), así como de marcadores moleculares del CEO confirmados y presuntos (MUC1, KLK10 y FOLR1). Resulta destacable que en lo concerniente al HLA de clase II se haya identificado como el antígeno tumoral número 1 de la lista a la mesotelina, que es un ligando confirmado de MUC16. Varios estudios han demostrado el papel esencial que el eje MUC16/MSLN tiene en la invasión celular y la metástasis en el marco del CEO, además de otros tumores como el cáncer de páncreas o el mesotelioma, lo cual sugiere la conveniencia de analizar los epítomos de linfocito T de tales antígenos en otras neoplasias malignas. Los inventores pudieron demostrar que la tinción de la MSLN aparece directamente correlacionada con la tinción de MUC16 y que la expresión profusa de la MSLN constituye un factor de pronóstico negativo del CEO.

Por primera vez se han empleado varios tejidos y tipos celulares benignos (PBMC, médula ósea, hígado, riñón, colon y ovario) para este tipo de determinación selectiva del inmunopeptidoma. A causa de las limitaciones en la cantidad de tipos de tejido disponibles para la investigación, los inventores no pueden descartar por completo que los antígenos no sean presentados también por moléculas HLA en otros órganos. Ahora bien, la relevancia funcional confirmada de tales antígenos en el CEO y, sobre todo, la inmunogenicidad de los péptidos respectivos en los individuos sanos, hace improbable que tales antígenos sean presentados en otros tejidos.

El término «respuesta de linfocitos T» define la proliferación y la activación específicas de las funciones efectoras inducidas por un péptido *in vitro* o *in vivo*. En el caso de los linfocitos T citotóxicos restringidos a MHC de clase I, las funciones efectoras pueden consistir en la lisis de células diana presentadoras naturales de péptido o bien sensibilizadas de manera repetida con un péptido o con un precursor del mismo; la secreción de citocinas, preferiblemente de interferón gamma, TNF-alfa o IL-2 inducida por péptido; la secreción de moléculas efectoras, preferiblemente granzimas o perforinas inducidas por péptido; o la desgranulación.

El término «péptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Los péptidos tienen preferiblemente 9 aminoácidos de longitud, pero pueden tener solo 8 aminoácidos de longitud, pero también hasta 10, 11 o 12 aminoácidos, y en el caso de los péptidos de MHC de clase II (variantes alargadas de los péptidos dados a conocer) pueden tener hasta 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos de longitud.

Además, el término «péptido» incluye sales de una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. Preferentemente las sales son sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos, como por ejemplo, sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato). Se ha de destacar que las sales de los péptidos acordes con la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en tales condiciones *in vivo*.

El término «péptido» incluye también «oligopéptido». El término «oligopéptido» designa aquí una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente mediante enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del oligopéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantenga el epítipo o epítipos adecuados. Los oligopéptidos suelen tener una longitud inferior a unos 30 aminoácidos y mayor de 15, aproximadamente.

El término «los péptidos de la presente invención» incluirá también el péptido que consta de un péptido tal y como se ha definido antes según la SEQ ID N.º82.

El término «polipéptido» designa una serie de residuos de aminoácidos conectados entre sí típicamente por enlaces peptídicos entre los grupos amino-alfa y carbonilo de los aminoácidos adyacentes. La longitud del polipéptido no es crucial en la invención, siempre que se mantengan los epítipos adecuados. En contraste con los términos «péptido» y «oligopéptido», el término «polipéptido» se refiere a las moléculas de más de unos 30 residuos de aminoácidos de longitud.

Un péptido, oligopéptido, proteína o polinucleótido que codifica dicha molécula es «inmunogénico» (y, por lo tanto, un «inmunógeno» en la presente invención), si es capaz de inducir una respuesta inmunitaria. En el caso de la presente invención, la inmunogenicidad se define más específicamente como la capacidad para desatar una respuesta por parte de los linfocitos T. Por lo tanto, un «inmunógeno» sería una molécula que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria y, en el caso de la presente invención, una molécula capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T. En otro aspecto, el inmunógeno puede ser el péptido, el complejo del péptido con MHC, el oligopéptido y/o la proteína que es utilizado para generar anticuerpos o TCR específicos contra él.

Un «epítipo» de clase I de un linfocito T requiere un péptido corto que esté unido a un receptor MHC de clase I, formando un complejo ternario (cadena alfa de MHC de clase I, beta-2-microglobulina y péptido) que puede ser reconocido por un linfocito T que lleve un receptor de linfocito T que coincida y que se una al complejo MHC/péptido con la afinidad adecuada. Los péptidos que se unen a moléculas MHC de clase I suelen tener una longitud de entre 8 y 14 aminoácidos, y más habitualmente de 9 aminoácidos.

En el ser humano hay tres locus genéticos diferentes que codifican las moléculas MHC de clase I (las moléculas MHC del ser humano también se denominan antígenos leucocitarios humanos [HLA]): HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A, HLA-B y HLA-C. HLA-A*01, HLA-A*02 y HLA-B*07 son ejemplos de distintos alelos MHC de clase I que se pueden expresar a partir de estos locus.

Tabla 5: Frecuencias de expresión F de HLA-A*02 y HLA-A*24 y los serotipos más frecuentes del HLA-DR. Las frecuencias se infieren de las frecuencias haplotípicas Gf en la población norteamericana adaptadas de Mori y cols. (Mori et al., 1997) empleando la fórmula de Hardy-Weinberg $F=1-(1-Gf)^2$. Las combinaciones de A*02 o A*24 con determinados alelos HLA-DR podrían ser más o menos abundantes de lo esperado a partir de sus frecuencias aisladas debido al desequilibrio de ligamiento. Para más detalles véase Chanock y cols. (Chanock et al., 2004).

ES 2 807 832 T3

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
A*02	Caucásica (América del Norte)	49,1%
A*02	Afroamericana (América del Norte)	34,1%
A*02	Asioamericana (América del Norte)	43,2%
A*02	Latinoamericana (América del Norte)	48,3%
DR1	Caucásica (América del Norte)	19,4%
DR2	Caucásica (América del Norte)	28,2%
DR3	Caucásica (América del Norte)	20,6%
DR4	Caucásica (América del Norte)	30,7%
DR5	Caucásica (América del Norte)	23,3%
DR6	Caucásica (América del Norte)	26,7%
DR7	Caucásica (América del Norte)	24,8%
DR8	Caucásica (América del Norte)	5,7%
DR9	Caucásica (América del Norte)	2,1%
DR1	Afroamericana (América del Norte)	13,20%
DR2	Afroamericana (América del Norte)	29,80%
DR3	Afroamericana (América del Norte)	24,80%
DR4	Afroamericana (América del Norte)	11,10%
DR5	Afroamericana (América del Norte)	31,10%
DR6	Afroamericana (América del Norte)	33,70%
DR7	Afroamericana (América del Norte)	19,20%
DR8	Afroamericana (América del Norte)	12,10%
DR9	Afroamericana (América del Norte)	5,80%
DR1	Asioamericana (América del Norte)	6,80%
DR2	Asioamericana (América del Norte)	33,80%
DR3	Asioamericana (América del Norte)	9,20%
DR4	Asioamericana (América del Norte)	28,60%
DR5	Asioamericana (América del Norte)	30,00%
DR6	Asioamericana (América del Norte)	25,10%
DR7	Asioamericana (América del Norte)	13,40%
DR8	Asioamericana (América del Norte)	12,70%
DR9	Asioamericana (América del Norte)	18,60%
DR1	Latinoamericana (América del Norte)	15,30%
DR2	Latinoamericana (América del Norte)	21,20%
DR3	Latinoamericana (América del Norte)	15,20%

(continuación)

Alelo	Población	Frecuencia fenotípica calculada a partir de la frecuencia alélica
DR4	Latinoamericana (América del Norte)	36,80%
DR5	Latinoamericana (América del Norte)	20,00%
DR6	Latinoamericana (América del Norte)	31,10%
DR7	Latinoamericana (América del Norte)	20,20%
DR8	Latinoamericana (América del Norte)	18,60%
DR9	Latinoamericana (América del Norte)	2,10%
A*24	Filipinas	65%
A*24	Nenets de Rusia	61%
A*24:02	Japón	59%
A*24	Malasia	58%
A*24:02	Filipinas	54%
A*24	India	47%
A*24	Corea del Sur	40%
A*24	Sri Lanka	37%
A*24	China	32%
A*24:02	India	29%
A*24	Australia occidental	22%
A*24	EE. UU.	22%
A*24	Samara (Rusia)	20%
A*24	América del Sur	20%
A*24	Europa	18%

5 El péptido de la invención, preferiblemente cuando figure incluido en una vacuna de la invención tal y como se describe en la presente memoria se unirá a diferentes tipos de HLA. Una vacuna también podría incluir péptidos que se unan a cualquier MHC de clase II y péptidos que se unan a otros alelos, que serán útiles para elaborar medicamentos personalizados. Por consiguiente, la vacuna dada a conocer puede ser usada para tratar el cáncer en pacientes que sean A*02 positivos, mientras que la no selección para los alotipos de MHC de clase II es necesaria debido a la naturaleza panunionista de esos péptidos.

10 En una forma de realización preferida, el término «secuencia nucleotídica» hace referencia a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos.

15 La secuencia nucleotídica que codifica un péptido, oligopéptido o polipéptido en particular puede ser natural o estar construida de forma sintética. Generalmente, los segmentos de ADN que codifican los péptidos, polipéptidos y proteínas de la presente invención se ensamblan a partir de fragmentos de ADNc y de oligonucleótidos cortos de enlace, o a partir de una serie de oligonucleótidos, con el fin de proporcionar un gen sintético capaz de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprenda elementos reguladores derivados de un operón microbiano o vírico.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria el término «un nucleótido que codifica un péptido» se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido y que incluye codones artificiales (sintetizados por el hombre) de inicio y terminación compatibles con el sistema biológico en el que la secuencia va a ser expresada por, por ejemplo, una célula dendrítica u otro sistema celular útil para la producción de TCR.

En la presente memoria, la referencia a una secuencia de ácido nucleico incluye tanto el ácido nucleico monocatenario como bicatenario. Por lo tanto, en lo que concierne por ejemplo al ADN, la secuencia específica, a menos que el contexto indique otra cosa, se refiere al ADN monocatenario de dicha secuencia, a la doble cadena formada por dicha secuencia con su complementaria (ADN bicatenario) y a la cadena complementaria de dicha secuencia.

El término «región codificante» hace referencia a la porción de un gen que, o bien de forma natural o normal, codifica el producto de expresión de dicho gen en su ambiente genómico natural, por ejemplo, la región que codifica *in vivo* el producto de expresión natural del gen.

La región codificante puede derivar de un gen no mutado («normal»), mutado o alterado, o incluso puede provenir de una secuencia de ADN, o gen, sintetizada íntegramente en el laboratorio con métodos bien conocidos para los expertos en la síntesis de ADN.

El término «producto de expresión» define al polipéptido o a la proteína que es el producto natural de la traducción del gen y cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifiquen los equivalentes resultantes de la degeneración del código genético y, por tanto, que codifican el mismo aminoácido o aminoácidos.

El término «fragmento», cuando se refiere a una secuencia de codificación, define una porción de ADN que no comprende la región codificante entera, cuyo producto de expresión conserva esencialmente la misma actividad o función biológica que el producto de expresión de la región codificante entera.

El término «segmento de ADN» hace referencia a un polímero de ADN, en forma de un fragmento separado o como componente de un constructo de ADN mayor, que deriva de ADN aislado por lo menos una vez en una forma sustancialmente pura, es decir, exento de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, la manipulación y la recuperación del segmento y de sus secuencias nucleotídicas constituyentes mediante métodos bioquímicos estándar como, por ejemplo, mediante un vector de clonación. Dichos segmentos se suministran en forma de un marco de lectura abierto sin interrupciones por secuencias internas no traducidas, o intrones, que suelen estar presentes en los genes eucariotas. Las secuencias de ADN no traducidas pueden estar presentes corriente abajo (*downstream*) desde el marco de lectura abierto, donde no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones codificantes.

El término «cebador» define una secuencia corta de ácidos nucleicos que puede aparearse con una cadena de ADN y que proporciona un extremo 3'-OH libre en el que una polimerasa de ADN puede comenzar la síntesis de una cadena de desoxirribonucleótidos.

El término «promotor» define una región de ADN implicada en la unión de la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción.

El término «aislado» define el material que se extrae de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si ocurre de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero ese mismo polinucleótido o polipéptido lo estará si es separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrán formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrán formar parte de una composición, y seguir estando aislados en dicho vector o composición puesto que estos no forman parte de su entorno natural.

Los polinucleótidos, y los polipéptidos recombinantes o inmunógenos, descritos de acuerdo con la presente invención también pueden presentarse en forma «purificada». El término «purificado» no implica pureza absoluta; más bien, se utiliza como definición relativa y puede incluir preparaciones altamente purificadas o preparaciones tan solo parcialmente purificadas, tal y como los expertos en la materia entienden dichos términos. Por ejemplo, los clones individuales aislados de una genoteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta obtener una homogeneidad electroforética. Se revela expresamente la purificación del material de inicio o del material natural hasta, al menos, un orden de magnitud; preferiblemente, dos o tres órdenes de magnitud; y, con mayor preferencia, cuatro o cinco órdenes de magnitud. Además, se contempla expresamente el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de, preferiblemente, el 99,999%, o, al menos, del 99,99% o el 99,9%; y, más convenientemente, del 99% por peso o mayor.

Los productos de expresión de los polipéptidos y los ácidos nucleicos descritos conforme a la presente invención, así como los vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y/o dichos polipéptidos, pueden utilizarse en «forma enriquecida». Tal y como se usa aquí, el término «enriquecido» significa que la concentración del material es, al menos, unas 2, 5, 10, 100 o 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), más ventajosamente 0,01% por peso, y, preferiblemente, aproximadamente de 0,1% al menos, por peso. También se contemplan preparaciones enriquecidas de alrededor del 0,5%, 1%, 5%, 10% y 20% por peso. Las secuencias, constructos, vectores, clones y otros materiales que comprenden la presente invención pueden utilizarse, según convenga, en su forma enriquecida o aislada.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos «porción», «segmento» y «fragmento», cuando se utilizan en relación a los polipéptidos, hacen referencia a una secuencia continua de residuos, como residuos de

5 aminoácidos, secuencia que es un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si un polipéptido se somete a un tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas habituales, como la tripsina o la quimiotripsina, los oligopéptidos resultantes de dicho tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido inicial. Utilizados en relación con los polinucleótidos, estos términos se refieren a los productos producidos por el tratamiento de dichos polinucleótidos con cualquiera de las endonucleasas.

Conforme a la presente invención, el término «identidad porcentual» o «porcentaje de identidad», al referirse a una secuencia, significa que una secuencia se compara con una secuencia reivindicada o descrita después de alinear la secuencia que se va a comparar (la «secuencia comparada») con la secuencia descrita o reivindicada (la «secuencia de referencia»). La identidad porcentual se determina entonces con la siguiente fórmula:

$$10 \quad \text{Identidad porcentual} = 100 [1 - (C/R)]$$

donde C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada, donde

- (i) cada base o aminoácido de la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineados en la secuencia comparada y
- 15 (ii) cada hueco (gap) de la secuencia de referencia y
- (iii) cada base o aminoácido alineado de la secuencia de referencia que difiere de una base o aminoácido alineado de la secuencia comparada, constituye una diferencia; y
- (iiii) la alineación tiene que comenzar en la posición 1 de las secuencias alineadas;

20 y R es el número de bases o aminoácidos de la secuencia de referencia a lo largo de la alineación con la secuencia comparada con cualquier hueco creado en la secuencia de referencia, también contabilizado como una base o un aminoácido.

Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad porcentual, calculada como se ha especificado arriba, es aproximadamente igual o mayor que una identidad porcentual mínima especificada, entonces la secuencia comparada guarda la identidad porcentual mínima especificada con la secuencia de referencia, aunque puedan existir alineaciones en las que la identidad porcentual calculada arriba resulte menor que la identidad porcentual especificada.

Tal y como se ha dicho antes, la presente invención proporciona por tanto un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 82.

30 En la presente invención el término «homólogo» se refiere al grado de identidad (véase antes Identidad porcentual) entre las secuencias de dos secuencias de aminoácidos, es decir secuencias peptídicas o polipeptídicas. La susodicha «homología» se determina comparando las dos secuencias alineadas en condiciones óptimas con las secuencias a comparar. La homología de secuencia se puede calcular creando una alineación con el algoritmo ClustalW, por ejemplo. Habitualmente las bases de datos públicas proporcionan software para el análisis de secuencias, en concreto, Vector NTI, GENETYX u otras herramientas.

35 Una persona versada en la materia será capaz de valorar si los linfocitos T inducidos por una variante del péptido específico serán capaces de reaccionar con el propio péptido (Appay et al., 2006; Colombetti et al., 2006; Fong et al., 2001; Zaremba et al., 1997).

40 Los linfocitos T pueden después reaccionar con células y matar las que expresen un polipéptido que contenga la secuencia de aminoácidos natural del péptido afin definido en los aspectos de la invención. Como se puede deducir de la bibliografía y de las bases de datos científicas, ciertas posiciones de los péptidos de unión a HLA son normalmente residuos de anclaje que forman una secuencia central que encaja en el motivo de unión del receptor HLA, que está definida por las propiedades polares, electrofísicas, hidrofóbicas y espaciales de las cadenas polipeptídicas que constituyen la hendidura de unión.

45 En una forma de realización de la presente invención, el péptido es una parte de una proteína de fusión que comprende, por ejemplo, los 80 aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (p33, en lo sucesivo "I") tal y como aparece en el NCBI, número de acceso de GenBank X00497. En otras fusiones, los péptidos de la presente invención se pueden fusionar con un anticuerpo tal y como se describe en la presente memoria, o con una parte funcional del mismo, en particular integrándolo en la secuencia del anticuerpo, para que vayan dirigidos específicamente por dicho anticuerpo, o por ejemplo, con un anticuerpo que es específico para las células dendríticas tal y como se describe en la presente memoria.

Además, el péptido puede ser modificado aún más para mejorar la estabilidad y/o la unión a las moléculas de MHC con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria más potente. Los métodos para conseguir esa optimización de una secuencia peptídica son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la introducción de enlaces no peptídicos.

55 Un enlace no peptídico es, por ejemplo: $-\text{CH}_2\text{-NH}$, $-\text{CH}_2\text{S-}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, $-\text{CH}=\text{CH-}$, $-\text{COCH}_2\text{-}$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{-}$ o $-\text{CH}_2\text{SO-}$.

La patente de EE. UU. 4.897.445 proporciona un método para la síntesis en fase sólida de enlaces no peptídicos (-CH₂-NH) en cadenas polipeptídicas que implica la obtención de polipéptidos con procedimientos estándar y la síntesis del enlace no peptídico mediante la reacción de un aminoaldehído y un aminoácido en presencia de NaCNBH₃.

5 Péptidos que comprenden las secuencias descritas arriba pueden ser sintetizados con otros grupos químicos añadidos en los extremos amino y/o carboxi, con el fin de mejorar la estabilidad, la biodisponibilidad y/o la afinidad de los péptidos. Por ejemplo, grupos hidrofóbicos como los grupos carbobenzoxilo, dansilo, o t-butiloxicarbonilo pueden añadirse a los extremos amino de los péptidos. De manera similar, se puede colocar un grupo acetilo o un grupo 9-fluorenilmetoxi-carbonilo en los extremos amino de los péptidos. Asimismo, p. ej., el grupo hidrofóbico t-butiloxicarbonilo, o un grupo amido pueden ser añadidos en los extremos carboxi de los péptidos.

Un péptido que incluye enlaces no peptídicos es una forma de realización preferida de la invención. En general, los péptidos (al menos aquellos que contienen enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámida, como muestra Lukas y cols. (Lukas et al., 1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección provisional del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformarían en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxicarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibenzhidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores (*scavengers*) utilizados normalmente son etandiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).

35 El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores (*scavengers*) se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

40 La purificación puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica o combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando p. ej., la separación con gradiente de acetonitrilo/agua.

45 El análisis de los péptidos puede efectuarse utilizando cromatografía de capa fina, electroforesis, en particular electroforesis capilar, extracción en fase sólida (CSPE), cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa, análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida y análisis con espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB), así como análisis con espectrometría de masas MALDI y ESI-Q-TOF.

50 Para seleccionar los péptidos sobrerrepresentados se calcula un perfil de presentación que muestra la presentación mediana de la muestra así como la variación de los duplicados. El perfil yuxtapone muestras de la entidad tumoral de interés con muestras de tejido normal de referencia. Cada uno de esos perfiles se puede después consolidar en una puntuación de sobrerrepresentación calculando el valor p de un modelo lineal de efectos mixtos (Pinheiro et al., 2015) ajustando para el análisis múltiple con la Tasa de descubrimiento falso (*False Discovery Rate*) (Benjamini and Hochberg, 1995).

55 Para la identificación y la cuantificación relativa de los ligandos HLA mediante espectrometría de masas se purificaron moléculas HLA de muestras de tejido criogenizadas y se aislaron los péptidos asociados a HLA. Los péptidos aislados se separaron y se identificaron sus secuencias mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas con ionización por nano-electronebulización (nanoESI) en línea. Las secuencias peptídicas resultantes se verificaron comparando el patrón de fragmentación de los TUMAP naturales registrados a partir de muestras de cáncer de ovario con los patrones de fragmentación de péptidos sintéticos de referencia de secuencia idéntica. Dado que los péptidos se identificaron directamente como ligandos de moléculas HLA de células primarias, estos resultados proporcionan pruebas directas del procesamiento y de la presentación de los péptidos identificados en

tejido de cáncer primario obtenido de 20 pacientes con cáncer de ovario.

La plataforma para el descubrimiento de fármacos patentada XPRESIDENT® v2.1 (véase por ejemplo US 2013-0096016) permite la identificación y la selección de candidatos a vacuna peptídica que están sobrerrepresentados en función de la cuantificación relativa de los niveles de péptidos restringidos a HLA en tejidos cancerosos respecto a diversos tejidos y órganos normales. Ello se consiguió mediante el desarrollo de la cuantificación diferencial sin marcador con los datos adquiridos de CL-EM procesados con una plataforma de análisis de datos patentada que combina algoritmos para la identificación de secuencias, agrupamiento de espectros, recuento iónico, alineamiento del tiempo de retención, deconvolución del estado de carga y normalización.

Se calcularon los niveles de presentación incluyendo estimaciones de error para cada péptido y cada muestra. Se identificaron los péptidos presentados exclusivamente en tejido tumoral y los péptidos sobrerrepresentados en tejido tumoral respecto a los tejidos y órganos no cancerosos.

Los complejos HLA-péptido de muestras de tejido de cáncer de ovario se purificaron y los péptidos asociados al HLA se aislaron y se analizaron con cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (CL-EM) (véanse los ejemplos). Todos los TUMAP contenidos en la presente solicitud se identificaron con esta estrategia en muestras de cáncer de ovario primario, que confirman su presentación en el cáncer de ovario primario.

Los TUMAP identificados en múltiples tejidos de cáncer de ovario y normales se cuantificaron con recuento iónico de los datos de CL-EM sin marcador. El método supone que las áreas de señal de CL-EM de un péptido están correlacionadas con su abundancia en la muestra. Todas las señales cuantitativas producidas por cada péptido en varios experimentos de CL-EM se normalizaron con medidas de tendencia central, se promediaron por muestra y se combinaron en un diagrama de barras, llamado perfil de presentación. El perfil de presentación combina diversos métodos de análisis como la búsqueda en bases de datos de proteínas, agrupación de espectros, deconvolución del estado de carga (descarga) y alineamiento del tiempo de retención y normalización.

La presente invención proporciona un péptido que es útil para el tratamiento de cánceres/tumores, preferentemente del cáncer de ovario, que sobrerrepresentan o presentan exclusivamente el péptido de la invención. La espectrometría de masas ha revelado que el péptido es presentado de forma natural por moléculas HLA en muestras humanas de cáncer de ovario primario.

Se ha demostrado que el gen o genes/proteína o proteínas originarios (también denominadas «proteínas enteras» o «proteínas subyacentes») del cual derivan los péptidos aparecen notablemente sobreexpresados en los tejidos cancerosos con respecto a los tejidos normales –en la presente invención «tejidos normales» significa que son células de tejido ovárico sano u otras células de tejidos normales– lo cual demuestra el alto grado de relación con el tumor de los genes originarios. Asimismo, los propios péptidos aparecen sobrerrepresentados intensamente en el tejido tumoral - «tejido tumoral» significa en relación con la presente invención una muestra procedente de una paciente aquejada de cáncer de ovario, pero no de tejidos normales.

Los péptidos de unión a HLA pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario, específicamente por los linfocitos T. Los linfocitos T pueden destruir las células que presentan el complejo HLA/péptido reconocido, por ejemplo células de cáncer de ovario que presenten los péptidos derivados.

El péptido de la presente invención ha demostrado su capacidad para estimular las respuestas de los linfocitos T y/o están sobrerrepresentados y, por tanto, pueden ser utilizados para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención. Asimismo, cuando los péptidos están formando un complejo con el MHC correspondiente pueden ser utilizados también para la producción de anticuerpos y/o TCR, en concreto TCR solubles, conforme a la presente invención. Los métodos pertinentes son conocidos por los expertos y también se pueden hallar en la bibliografía pertinente. Así pues, el péptido de la presente invención es útil para generar en un paciente una respuesta inmunitaria con la que destruir células tumorales. La respuesta inmunitaria se puede inducir en el paciente con la administración directa de los péptidos descritos o de sustancias precursoras adecuadas (p. ej., péptidos alargados, proteínas o ácidos nucleicos que codifiquen dichos péptidos), idealmente en combinación con un agente que potencie la inmunogenicidad (un adyuvante). Cabe esperar que la respuesta inmunitaria generada por esa vacunación terapéutica sea muy específica contra las células tumorales porque los tejidos normales no contienen los péptidos diana de la presente invención en un número comparable de copias, lo cual evita el riesgo de reacciones autoinmunitarias perjudiciales contra las células normales del paciente.

La presente descripción también se refiere a los receptores de los linfocitos T (TCR) que comprenden una cadena alfa y una cadena beta (“TCR alfa/beta”). La presente descripción también se refiere a ácidos nucleicos, vectores y células huésped para la expresión de TCR y péptidos de la presente descripción; y métodos para la utilización de los mismos.

El término “receptor de los linfocitos T” (abreviado TCR) se refiere a una molécula heterodimérica que comprende una cadena polipeptídica alfa (cadena alfa) y una cadena polipeptídica beta (cadena beta), en la que el receptor heterodimérico es capaz de unirse a un antígeno polipeptídico presentado por una molécula de HLA. El término también incluye los llamados TCR gamma/delta.

En una realización, la descripción proporciona un método para producir un TCR como se ha descrito en la presente memoria, en el que dicho método comprende cultivar una célula huésped capaz de expresar el TCR en condiciones adecuadas para estimular la expresión del TCR.

5 En otro aspecto, la descripción se refiere a métodos según la descripción en los que el antígeno se carga en moléculas MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula adecuada presentadora de antígeno o una célula presentadora de antígeno artificial poniendo en contacto una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno, o cargando el antígeno en tetrámeros de MHC de clase I mediante la conversión en tetrámeros de los monómeros del complejo formado por antígeno/MHC de clase I.

10 Las cadenas alfa y beta de los TCR alfa/beta, y las cadenas gamma y delta de los TCR gamma/delta, se considera generalmente que tienen dos "dominios", a saber: los dominios variable y constante. El dominio variable consiste en una concatenación de región variable (V) y de región de unión (J). El dominio variable puede incluir también una región líder (L). Las cadenas beta y delta pueden incluir también una región de diversidad (D). Los dominios constantes alfa y beta pueden incluir también dominios transmembranarios (TM) en el extremo C-terminal, que anclan las cadenas alfa y beta a la membrana celular.

15 En lo que se refiere a los TCR gamma/delta, el término "dominio variable gamma del TCR", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la concatenación de la región gamma V del TCR (TRGV) sin la región líder (L), y la región gamma J del TCR (TRGJ), y el término dominio constante gamma del TCR se refiere a la región TRGC extracelular, o a una secuencia TRGC truncada en el extremo C-terminal. Asimismo, el término "dominio variable delta del TCR" se refiere a una concatenación de la región delta V del TCR (TRDV) sin la región líder (L) y la región delta D/J del TCR (TRDD/TRDJ), y el término "dominio constante delta del TCR" se refiere a la región TRDC extracelular, o a una secuencia TRDC truncada en el extremo C-terminal.

20 Los TCR de la presente descripción se unen preferiblemente a un complejo de péptido -molécula de HLA con una afinidad de unión (KD) de aproximadamente 100 μ M o menos, aproximadamente 50 μ M o menos, aproximadamente 25 μ M o menos, o aproximadamente 10 μ M o menos. Son más preferidos los TCR de elevada afinidad, que presentan afinidades de unión de aproximadamente 1 μ M o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos. Los ejemplos no limitantes de los intervalos preferidos de afinidades de unión de los TCR de la presente invención incluyen desde aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 10 nM; desde aproximadamente 10 nM hasta aproximadamente 20 nM; desde aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 30 nM; desde aproximadamente 30 nM hasta aproximadamente 40 nM; desde aproximadamente 40 nM hasta aproximadamente 50 nM; desde aproximadamente 50 nM hasta aproximadamente 60 nM; desde aproximadamente 60 nM hasta aproximadamente 70 nM; aproximadamente 70 nM hasta aproximadamente 80 nM; desde aproximadamente 80 nM hasta aproximadamente 90 nM; y desde aproximadamente 90 nM hasta aproximadamente 100 nM.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria en relación con los TCR de la presente descripción, «unión específica» y las variantes gramaticales de su expresión, se utilizan para referirse a TCR que tienen una afinidad de unión (KD) para un complejo de péptido-molécula de HLA de 100 μ M o menos.

35 Los TCR heterodiméricos alfa/beta de la presente descripción pueden incorporar un enlace disulfuro entre los dominios constantes. Los TCR preferidos de este tipo incluyen aquellos que tienen una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, con la salvedad de que la Thr 48 de TRAC y la Ser 57 de TRBC1 o TRBC2 están sustituidas por residuos de cisteína, y dichas cisteínas forman un enlace disulfuro entre la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR.

40 Independientemente de la inserción del enlace entre cadenas mencionado anteriormente, los TCR alfa/beta heterodiméricos de la presente descripción pueden tener una secuencia de dominio constante TRAC y una secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2, y la secuencia de dominio constante TRAC y la secuencia de dominio constante TRBC1 o TRBC2 del TCR pueden estar unidas por el enlace disulfuro natural entre la Cys4 del exón 2 de TRAC y la Cys2 del exón 2 de TRBC1 o TRBC2.

45 Los TCR de la presente descripción pueden comprender un marcador detectable seleccionado a partir del grupo formado por un radionúclido, un fluoróforo y biotina. Los TCR de la presente descripción pueden estar conjugados con un agente terapéuticamente activo, tal como un radionúclido, un agente de quimioterapia, o una toxina.

50 En una realización, un TCR de la presente descripción que porta al menos una mutación en la cadena alfa y/o que porta al menos una mutación en la cadena beta tiene un patrón de glucosilación modificado en comparación con el TCR no mutado.

55 En una realización, un TCR que comprende al menos una mutación en la cadena alfa del TCR y/o la cadena beta del TCR tiene una afinidad de unión a, y/o una semivida de unión a, un complejo de péptido de la invención-molécula de HLA, que es por lo menos el doble de la de un TCR que comprende una cadena alfa no mutada del TCR y/o una cadena beta no mutada del TCR. El aumento de la afinidad de los TCR específicos de tumores, y su aprovechamiento, se basa en la existencia de un intervalo de afinidades óptimas del TCR. La existencia de dicho

intervalo se basa en observaciones que indican que los TCR específicos para los patógenos restringidos por HLA-A2 tienen valores de KD que son aproximadamente 10 veces menores que los de los TCR específicos para autoantígenos asociados a tumores restringidos por HLA-A2. En la actualidad se sabe que, aunque los antígenos tumorales pueden ser inmunogénicos, debido a que los tumores se desarrollan a partir de las propias células del individuo, solo las proteínas mutadas o que porten alteraciones debidas a procesamiento traduccional serán reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario. Los antígenos que están regulados al alza o sobreexpresados (los llamados autoantígenos) no inducirán necesariamente una respuesta inmunitaria funcional contra el tumor: los linfocitos T que expresan TCR que son muy reactivos contra estos antígenos habrán sido seleccionados negativamente en el interior del timo en un proceso conocido como tolerancia central, lo que significa que solo permanecen los linfocitos T con TCR de baja afinidad para los autoantígenos. Por consiguiente, la afinidad de los TCR o de las variantes de la presente descripción por un péptido de la invención puede aumentarse por métodos bien conocidos en la técnica.

La presente descripción se refiere también a un método para la identificación y el aislamiento de un TCR según la presente descripción, en el que dicho método comprende la incubación de PBMC procedentes de donantes sanos negativos para HLA-A*02 con monómeros de A2/péptido, la incubación de las PBMC con los tetrámeros conjugados con ficoeritrina (PE), y el aislamiento de los linfocitos T de elevada afinidad mediante análisis y selección de células activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

La presente descripción también se refiere a un método para la identificación y el aislamiento de un TCR según la presente descripción, en que dicho método comprende la obtención de un ratón transgénico que porta todo el locus genético TCR $\alpha\beta$ humano (1,1 y 0,7 Mb), cuyos linfocitos T expresan un repertorio diverso de TCR humanos que compensan la deficiencia de TCR de los ratones, la inmunización del ratón con un péptido, la incubación de las PBMC obtenidas a partir de ratones transgénicos con tetrámeros conjugados con ficoeritrina (PE), y el aislamiento de los linfocitos T de elevada afinidad mediante análisis y selección de células activada por fluorescencia (FACS)–Calibur.

En un aspecto, para obtener linfocitos T que expresan TCR de la presente descripción, se clonan ácidos nucleicos que codifican las cadenas TCR-alfa y/o TCR-beta de la presente descripción en vectores de expresión, tales como retrovirus gamma o lentivirus. Se generan virus recombinantes y después se analizan para comprobar sus características funcionales, tales como la especificidad antigénica y la afinidad funcional. Después se utiliza una parte alícuota del producto final para la transducción de la población diana de linfocitos T (purificada generalmente a partir de las del paciente), que se expande antes de su infusión en el paciente.

En otro aspecto, para obtener linfocitos T que expresen los TCR de la presente descripción, se sintetizan ARN de los TCR con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo: sistemas de transcripción in vitro. Los ARN de los TCR sintetizados in vitro se introducen después en los linfocitos CD8+ primarios obtenidos a partir de donantes sanos mediante electroporación para volver a expresar las cadenas, específicas del tumor, TCR-alfa y/o TCR-beta.

Para aumentar la expresión, los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden conectarse de forma funcional con promotores potentes, tales como las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, citomegalovirus (CMV), virus U3 de las células madre de ratón (MSCV), fosfoglicerato-quinasa (PGK), β -actina, ubiquitina, y un promotor compuesto del virus de los simios 40 (SV40)/CD43, factor de elongación (EF)-1a y el promotor del virus productor de focos esplénicos (SFFV). En una realización preferida, el promotor es heterólogo respecto al ácido nucleico que se va a expresar.

Además de promotores potentes, las casetes de expresión de TCR de la presente descripción pueden contener otros elementos que pueden potenciar la expresión transgénica, incluida una región central de polipurinas (cPPT), que facilita la traslocación al núcleo de los constructos lentivíricos (Follenzi et al., 2000), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota americana (wPRE), que incrementa el nivel de la expresión transgénica al aumentar la estabilidad del ARN (Zufferey et al., 1999).

Las cadenas alfa y beta de un TCR de la presente invención pueden estar codificadas por ácidos nucleicos localizados en vectores separados, o pueden estar codificadas por polinucleótidos situados en el mismo vector.

Para obtener un elevado nivel de expresión superficial de TCR es necesario que ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducidos se transcriban a niveles elevados. Con este fin, las cadenas TCR-alfa y TCR-beta de la presente descripción pueden clonarse en constructos bicistrónicos en un solo vector, una estrategia que ha demostrado ser capaz de superar este obstáculo. La utilización de un sitio de entrada intrarribosómico vírico (IRES) entre las cadenas TCR-alfa y TCR-beta permite la expresión coordinada de ambas cadenas, ya que las cadenas TCR-alfa y TCR-beta se generan a partir de un solo transcrito que se escinde en dos proteínas durante la traducción, con lo que se garantiza la producción de cadenas TCR-alfa y TCR-beta con la misma relación molar. (Schmitt et al. 2009).

Los ácidos nucleicos que codifican los TCR de la presente descripción pueden tener los codones optimizados para aumentar la expresión en una célula huésped. La redundancia del código genético permite que algunos aminoácidos estén codificados por más de un codón, pero algunos codones son menos “óptimos” que otros debido a la

disponibilidad relativa de los correspondientes ARNt, así como a otros factores (Gustafsson et al., 2004). La modificación de las secuencias de los genes de TCR-alfa y TCR-beta de modo que cada aminoácido esté codificado por el codón óptimo para la expresión genética en mamíferos, así como la eliminación de los motivos de inestabilidad del ARNm o de sitios de ajuste crípticos, ha demostrado aumentar significativamente la expresión de los genes TCR-alfa y TCR-beta (Scholten et al., 2006).

Además, la falta de emparejamiento (mispairing) entre las cadenas de TCR introducidas y las endógenas puede dar lugar a la adquisición de características específicas que puedan constituir un riesgo significativo de respuestas autoinmunitarias. Por ejemplo, la formación de dímeros mixtos de TCR puede reducir el número de moléculas de CD3 disponibles para formar complejos de TCR con el emparejamiento adecuado, por lo que puede disminuir significativamente la afinidad funcional de las células que expresan el TCR introducido (Kuball et al., 2007).

Para reducir la falta de emparejamiento, el dominio C-terminal de las cadenas de TCR introducidas según la presente descripción pueden modificarse con el objeto de estimular la afinidad entre las cadenas, mientras se disminuye la capacidad de las cadenas introducidas de emparejarse con las cadenas endógenas de TCR. Estas estrategias pueden incluir la sustitución de los dominios C-terminales de TCR-alfa y TCR-beta humanos con sus dominios equivalentes en ratones (dominio C-terminal "murinizado"); la generación de un segundo enlace disulfuro entre las cadenas en el dominio C-terminal mediante la introducción de un segundo residuo de cisteína en ambas cadenas TCR-alfa y TCR-beta del TCR introducido (modificación de cisteínas); el intercambio de los residuos que interactúan en los dominios C-terminales de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta ("saliente en hueco", knob-in-hole); y la fusión de los dominios variables de las cadenas TCR-alfa y TCR-beta directamente con CD3 ζ (fusión con CD3 ζ). (Schmitt et al. 2009).

En una realización, una célula huésped se modifica para que exprese un TCR de la presente descripción. En realizaciones preferidas, la célula huésped es un linfocito T o un progenitor de linfocitos T humano. En algunas realizaciones el linfocito T o progenitor de linfocitos T se obtiene a partir de un paciente aquejado de cáncer. En otras realizaciones el linfocito T o progenitor de linfocitos T se obtienen a partir de un donante sano. Las células huésped de la presente descripción pueden ser alogénicas o autólogas respecto al paciente que se va a tratar. En una realización la célula huésped es un linfocito T gamma/delta transformado para que exprese un TCR alfa/beta.

Una «composición farmacéutica» es una composición apta para la administración a un ser humano en un contexto médico. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica es estéril y se fabrica conforme a las directrices de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable (véase también más arriba). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sal farmacéuticamente aceptable» se refiere a un derivado de los péptidos descritos en el que el péptido es modificado para obtener sales ácidas o básicas del agente. Por ejemplo, las sales ácidas se preparan a partir de la base libre (normalmente la forma neutra del fármaco posee un grupo -NH₂ neutro) haciéndola reaccionar con un ácido adecuado. Ácidos adecuados para la preparación de sales ácidas incluyen tanto ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinnámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares, como ácidos inorgánicos, como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. A la inversa, la preparación de sales básicas a partir de grupos ácidos que pueden estar presentes en un péptido se preparan empleando una base farmacéuticamente aceptable como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares.

En una forma de realización especialmente preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos en forma de sales de ácido acético (acetatos), trifluoroacetatos o ácido clorhídrico (cloruros).

Preferiblemente, el medicamento de la presente invención es un agente inmunoterapéutico como una vacuna. La vacuna puede administrarse directamente al paciente, en el órgano afectado o por vía sistémica de forma i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v., o aplicarse *ex vivo* a células derivadas del paciente o a una línea celular humana que después se administra al paciente, o utilizarse *in vitro* para seleccionar una subpoblación de células inmunitarias derivadas del paciente que después se le vuelven a administrar. Si el ácido nucleico se administra a células *in vitro*, puede ser útil que estas células sean transfectadas para que expresen simultáneamente citocinas inmunoestimuladoras, como la interleucina-2. El péptido puede ser sustancialmente puro, o combinarse con un adyuvante inmunoestimulador (véase abajo) o utilizarse en combinación con citocinas inmunoestimuladoras, o bien administrarse mediante otro sistema de liberación adecuado, como por ejemplo liposomas. El péptido también se puede conjugar con un transportador adecuado como la hemocianina de lapa californiana (KLH) o el manano (véase WO 95/18145 y (Longenecker et al., 1993)). El péptido también puede estar marcado, o ser una proteína de fusión, o ser una molécula híbrida. Se espera que los péptidos cuya secuencia se ofrece en la presente invención estimulen a los linfocitos T CD4 o CD8. No obstante, la estimulación de los linfocitos T CD8 es más eficiente si cuentan con la ayuda de los linfocitos T cooperadores CD4. Así pues, en el caso de los epítomos de MHC de clase I que estimulan a los linfocitos T CD8 la pareja de fusión o las secciones de una molécula híbrida adecuada proporcionan epítomos que estimulan a los linfocitos T CD4-positivos. Los epítomos estimuladores de los CD4 y los CD8 son bien conocidos en

la técnica e incluyen los identificados en la presente invención.

En un aspecto, la vacuna comprende al menos un péptido dotado de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º 82, y al menos otro péptido adicional, preferiblemente dos a 50, más preferiblemente dos a 25, incluso más preferiblemente dos a 20 y más preferiblemente aún dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete o dieciocho péptidos. Los péptidos pueden derivar de uno o más TAA específicos y se pueden unir a moléculas MHC de clase I.

Otro aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico (por ejemplo un polinucleótido) que codifica un péptido de la invención. El polinucleótido puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los mismos, monocatenarios y/o bicatenarios, o formas nativas o estabilizadas de polinucleótidos, como por ejemplo, polinucleótidos con un esqueleto de fosforotioato y que pueden contener intrones siempre que codifique el péptido. Por supuesto, solo los péptidos que contengan residuos de aminoácidos naturales unidos por enlaces peptídicos naturales pueden ser codificados por un polinucleótido. Otro aspecto más de la invención proporciona un vector de expresión que expresa un polipéptido acorde con la invención.

Se han desarrollado diversos métodos para unir polinucleótidos, especialmente ADN, a vectores, por ejemplo a través de extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, al segmento de ADN se le pueden añadir prolongaciones de homopolímeros complementarios para insertarlo en el vector de ADN. El vector y el segmento de ADN se unen a continuación por medio de puentes de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinante.

Otro método alternativo para unir el segmento de ADN a los vectores son los ligadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción. Existen ligadores sintéticos comerciales que contienen diversas dianas para las endonucleasas de restricción que facilitan varios proveedores como International Biotechnologies Inc. New Haven, CN, EE.UU.

Un método deseable para modificar el ADN que codifica el polipéptido de la invención emplea la reacción en cadena de la polimerasa tal y como exponen Saiki RK y cols. (Saiki et al., 1988). Este método puede ser utilizado para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo diseñando las dianas de restricción adecuadas, o puede ser empleado para modificar el ADN de otros modos útiles conocidos en la técnica. Si se opta por vectores virales, son preferibles los vectores poxvíricos o adenovíricos.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) se puede expresar en un hospedador adecuado para producir un polipéptido que comprenda el péptido o variante de la invención. Así pues, el ADN que codifica el péptido o variante de la invención puede ser utilizado conforme a técnicas conocidas, modificado adecuadamente siguiendo las enseñanzas contenidas en la presente memoria para construir un vector de expresión que se emplee para transformar una célula hospedadora a fin de que exprese y produzca el polipéptido de la invención. Tales técnicas incluyen las dadas a conocer en las patentes de EE.UU. N.º 4.440.859, 4.530.901, 4.582.800, 4.677.063, 4.678.751, 4.704.362, 4.710.463, 4.757.006, 4.766.075 y 4.810.648.

El ADN (o ARN en el caso de los vectores retrovíricos) que codifica el polipéptido que constituye el compuesto de la invención se puede unir con una amplia variedad de secuencias de ADN distintas para introducirlo en un hospedador adecuado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del hospedador, el modo de introducir el ADN en su interior y de si se pretende que se integre o que se mantenga como un episoma.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, como un plásmido, con la orientación apropiada y el marco de lectura correcto para asegurar la expresión. Si es necesario, el ADN se puede enlazar con secuencias nucleotídicas de control que regulan la transcripción o la traducción y que son reconocidas por el hospedador deseado, aunque en general tales controles ya suelen estar incluidos en el propio vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el hospedador mediante técnicas estándar. En general, el vector no consigue transformar todos los hospedadores, lo que hará necesario seleccionar las células hospedadoras que hayan quedado transformadas. Una técnica de selección consiste en incorporar en el vector de expresión una secuencia de ADN con los elementos de control necesarios que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, como por ejemplo de resistencia a antibióticos.

Otra alternativa consiste en incorporar el gen de ese rasgo seleccionable en otro vector con el que se cotransforma la célula hospedadora.

Las células hospedadoras que hayan sido transformadas con el ADN recombinante de la invención se cultivarán durante el tiempo suficiente y en las condiciones apropiadas que las personas versadas en la técnica conocen a la vista de las enseñanzas descritas en la presente memoria para que el polipéptido pueda expresarse y, finalmente, ser recuperado.

Son muchos los sistemas de expresión conocidos, como bacterias (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), hongos filamentosos (género *Aspergillus*, etc.), células vegetales, animales o de insectos. Preferiblemente el sistema consistirá en células de mamífero, como las células CHO disponibles de la ATCC Cell Biology Collection.

Un típico vector plasmídico de expresión constitutiva para células de mamífero comprende el promotor del CMV o el del SV40 con una cola poli-A adecuada y un marcador de resistencia como la neomicina. Un ejemplo es el pSVL que ofrece Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Un ejemplo de vector de expresión inducible para mamífero es el pMSG, también suministrado por Pharmacia. Otros vectores plasmídicos de levadura son pRS403-406 y pRS413-416, en general proveídos por Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos integrativos de levadura (YIp) que incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levadura (Ycp). Los vectores dotados del promotor del CMV (por ejemplo de Sigma-Aldrich) proporcionan una expresión transitoria o estable, expresión en el citoplasma o secreción, y marcador de los extremos N-terminal o C-terminal en varias combinaciones de FLAG, 3xFLAG, c-myc o MAT. Estas proteínas de fusión permiten la detección, la purificación y el análisis de la proteína recombinante. Las fusiones con doble etiqueta aportan flexibilidad a la detección.

La potente región reguladora promotora del citomegalovirus (CMV) humano ofrece niveles de expresión constitutiva de la proteína muy elevados, de hasta 1 mg/l en células COS. En estirpes celulares menos potentes los niveles de proteínas suelen rondar ~0,1 mg/l. La presencia del origen de replicación del SV40 genera niveles elevados de replicación del ADN en células COS que toleran la replicación del SV40. Los vectores de CMV, por ejemplo, pueden contener el origen pMB1 (derivado del pBR322) para la replicación en células bacterianas, el gen de la b-lactamasa para la selección por resistencia a la ampicilina, hGH poliA, y el origen f1. Los vectores que contienen la secuencia líder de la preprotripsina (PPT) pueden canalizar la secreción de las proteínas de fusión FLAG hacia el medio de cultivo, donde se pueden purificar por medio de anticuerpos anti-FLAG, resinas y placas. En la técnica se conocen otros vectores y sistemas de expresión aptos para el uso con una variedad de células hospedadoras.

En otra forma de realización dos o más péptidos de la invención se codifican y se expresan en orden sucesivo (similar a constructos de «collar de cuentas»). Al hacerlo, los péptidos se pueden enlazar o fusionar juntas mediante segmentos de aminoácidos enlazantes, como por ejemplo LLLLLL, o se pueden unir sin ningún otro péptido adicional entre ellos. Estos constructos también pueden ser utilizados para la terapia contra el cáncer, y podrían inducir respuestas inmunitarias en las que intervengan tanto el MHC I como el MHC II.

La presente invención también se refiere a una célula hospedadora transformada con un vector polinucleotídico de la presente invención. La célula hospedadora puede ser procarionota o eucariota. Las células bacterianas pueden ser las células hospedadoras procarionotas más adecuadas en determinadas circunstancias; normalmente son cepas de *E. coli*, como por ejemplo las cepas DH5 disponibles de Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (N.º ATCC 31343). Las células hospedadoras eucariotas preferidas son células de levadura, de insecto y de mamífero, preferiblemente células de vertebrado como estirpes celulares de colon y de fibroblastos de ratón, rata, mono o ser humano. Las células hospedadoras de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que en general pueden obtenerse de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células hospedadoras de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles de la ATCC como CCL61, las células embrionarias de ratón suizo NIH/3T3 disponibles de la ATCC como CRL 1658, las células COS-1 de riñón de mono disponibles de la ATCC como CRL 1650 y las células 293 que son células renales embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son las células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión baculovíricos. Se puede encontrar una revisión general referente a la elección de las células hospedadoras más adecuadas por ejemplo en el manual de Paulina Balbás y Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9, y otra bibliografía conocida por las personas versadas.

La transformación de las células hospedadoras adecuadas con el constructo de ADN de la presente invención se consume con métodos consabidos que normalmente dependen del tipo de vector utilizado. En lo referente a la transformación de células hospedadoras procarionotas, véanse por ejemplo Cohen y cols. (Cohen et al., 1972) y (Green and Sambrook, 2012). La transformación de células de levadura se describe en Sherman y cols. (Sherman et al., 1986). El método de Beggs (Beggs, 1978) también resulta útil. En lo que concierne a los reactivos adecuados para transfectar las células de vertebrados, por ejemplo el fosfato de calcio y el DEAE-dextrano o las formulaciones con liposomas, se pueden adquirir de Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU. La electroporación también es útil para la transformación y/o transfección de las células y es perfectamente conocida su aplicación en la transformación de células de levadura, bacteria, insecto y vertebrado.

Las células transformadas con éxito, es decir, las que contengan un constructo de ADN de la presente invención, se pueden identificar con técnicas bien conocidas como la PCR. Otra alternativa consiste en detectar la presencia de la proteína en el sobrenadante por medio de anticuerpos.

Se apreciará que ciertas células hospedadoras de la invención son útiles para la preparación del péptido de la invención, por ejemplo las células bacterianas, de levadura e insecto. Con todo, para ciertos métodos terapéuticos pueden ser útiles otras células hospedadoras. Por ejemplo, se pueden utilizar células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, para expresar el péptido de la invención de tal forma que pueda ser cargado en las moléculas MHC oportunas. Así pues, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o un vector de expresión conforme a la invención.

En una forma de realización preferida la célula hospedadora es una célula presentadora de antígeno, en particular una célula dendrítica o célula presentadora de antígeno. Las APC cargadas con una proteína de fusión recombinante que contiene fosfatasa ácida prostática (PAP) fueron aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA) el 29 de abril de 2010 para tratar el cáncer de próstata hormonorrefractario metastásico asintomático o mínimamente sintomático (Sipuleucel-T) (Rini et al., 2006; Small et al., 2006).

Otro aspecto de la invención proporciona un método para la producción de un péptido, comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora y el aislamiento del péptido a partir de dicha célula o de su medio de cultivo.

En otra forma de realización el péptido, el ácido nucleico o el vector de expresión de la invención se emplean en medicina. Por ejemplo, el péptido puede ser preparado para la inyección por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intraperitoneal (i.p.) o intramuscular (i.m.). Los métodos preferidos para la inyección del péptido incluyen s.c., i.d., i.p., i.m. e i.v. Los métodos preferidos para la inyección del ADN incluyen i.d., i.m., s.c., i.p. e i.v. Según el péptido o ADN de que se trate se pueden administrar dosis de, por ejemplo, entre 50 µg y 1,5 mg, preferiblemente de 125 µg a 500 µg de péptido o ADN. Dosis en esos intervalos se han empleado con éxito en varios ensayos (Walter et al., 2012).

El polinucleótido usado para la vacunación activa puede ser sustancialmente puro, o estar contenido en un vector o en un sistema de liberación adecuado. El ácido nucleico puede ser ADN, ADNc, APN, ARN o una combinación de los mismos. Los métodos para diseñar e introducir ese ácido nucleico son bien conocidos por los expertos en la materia. Una perspectiva general se puede consultar por ejemplo en Teufel y cols. (Teufel et al., 2005). Las vacunas polinucleotídicas son fáciles de preparar, pero el mecanismo por el cual tales vectores inducen la respuesta inmunitaria no se conoce con exactitud. Los vectores y sistemas de liberación adecuados incluyen los de ADN y/o ARN viral, como los sistemas basados en adenovirus, virus vacunal, retrovirus, herpesvirus, virus adeno-asociados o híbridos que contienen elementos de varios virus. Los sistemas de liberación no virales incluyen lípidos catiónicos y polímeros catiónicos que son bien conocidos como técnicas para la introducción de ADN. Los métodos de introducción físicos, como la "pistola génica", también pueden utilizarse. El péptido o péptidos codificados por el ácido nucleico pueden ser una proteína de fusión, por ejemplo con un epítipo que estimule los linfocitos T para el respectivo CDR opuesto tal y como se ha indicado antes.

El medicamento de la invención también puede incluir uno o varios adyuvantes. Los adyuvantes son sustancias que potencian o estimulan de forma inespecífica la respuesta inmunitaria (p. ej., respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T CD8-positivos y linfocitos T cooperadores (TH) contra un antígeno, por lo que podrían ser considerados útiles en el medicamento de la presente invención. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen, entre otros: 1018 ISS, sales de aluminio, AMPLIVAX[®], AS15, BCG, CP-870.893, CpG7909, CyaA, dSLIM, ligandos de flagelina o TLR5 derivados de flagelina, ligando de FLT3, GM-CSF, IC30, IC31, imiquimod (ALDARA[®]), resiquimod, ImuFact IMP321, interleucinas como IL-2, IL-13, IL-21, interferón alfa o beta o derivados pegilados de los mismos, IS Patch, ISS, ISCOMATRIX, ISCOMs, JuvImmune[®], LipoVac, MALP2, MF59, lípido monofosforilo A, Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, emulsiones de agua en aceite y de aceite en agua, OK-432, OM-174, OM-197-MP-EC, ONTAK, OspA, sistema de vectores PepTel[®], micropartículas de dextrano y poli(láctido co-glicólido) [PLG], talactoferrina SRL172, virosomas y otras partículas similares a virus, YF-17D, VEGF trap, R848, beta-glucano, Pam3Cys, estímulo QS21 de Aquila, que deriva de la saponina, extractos de micobacterias y miméticos sintéticos de la pared bacteriana, y otros adyuvantes patentados como Detox de Ribi, Quil o Superfos. Se prefieren los adyuvantes como el adyuvante de Freund o el GM-CSF. Con anterioridad se han descrito varios adyuvantes inmunológicos (p. ej., MF59) específicos para las células dendríticas, así como la preparación de los mismos (Allison and Krummel, 1995). También pueden utilizarse citocinas. A varias citocinas se les ha atribuido una influencia directa en la migración de las células dendríticas hacia los tejidos linfoides (p. ej., el TNF-), como parte de un proceso que acelera su maduración hasta convertirlas en células presentadoras antígeno de los linfocitos T (p. ej., GM-CSF, IL-1 e IL-4) (Patente de EE.UU. N.º 5.849.589) y en el que actúan como inmoadyuvantes (p. ej., la IL-12, IL-15, IL-23, IL-7, IFN-alfa, IFN-beta) (Gabrilovich et al., 1996).

También se ha descrito que los oligonucleótidos de CpG inmunoestimuladores potencian los efectos de los adyuvantes en las vacunas. Sin limitarse a la teoría, los oligonucleótidos de CpG actúan activando el sistema inmunitario innato (no adaptativo) a través de los receptores de tipo Toll (TLR), principalmente el TLR9. La activación del TLR9 desencadenada por los CpG potencia las respuestas humorales y celulares específicas de antígeno contra una amplia gama de antígenos, incluidos antígenos peptídicos o proteicos, virus vivos o muertos, vacunas de células dendríticas, vacunas de células autólogas y conjugados de polisacáridos, tanto en vacunas profilácticas como terapéuticas. Más importante aún, potencian la maduración y la diferenciación de las células dendríticas, lo cual resulta en una mayor activación de los linfocitos TH1 y una generación más potente de linfocitos T citotóxicos (CTL), incluso sin la ayuda de los linfocitos T CD4. La tendencia hacia la respuesta TH1 provocada por la estimulación del TLR9 se mantiene incluso en presencia de adyuvantes vacunales como el aluminio o el adyuvante de Freund incompleto (IFA) que normalmente promueven un sesgo hacia la respuesta TH2. Los oligonucleótidos de CpG muestran incluso una mayor actividad adyuvante cuando se formulan o administran conjuntamente con otros adyuvantes o en formulaciones como micropartículas, nanopartículas, emulsiones de lípidos o formulaciones similares, que son especialmente necesarias para inducir una respuesta potente cuando el antígeno es relativamente débil. También aceleran la respuesta inmunitaria y permiten reducir las dosis de antígeno aproximadamente en dos órdenes de magnitud, y se han obtenido en algunos experimentos respuestas de

anticuerpos comparables a las conseguidas con la dosis completa de vacuna sin CpG (Krieg, 2006). La patente de EE. UU. N.º 6.406.705 B1 describe el uso combinado de oligonucleótidos de CpG, adyuvantes sin ácidos nucleicos y un antígeno para inducir una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Un componente preferido de la composición farmacéutica de la presente invención es un antagonista CpG del TLR9 conocido como dSLIM (inmunomodulador en horquilla doble), fabricado por Mologen (Berlín, Alemania). También se pueden utilizar otras moléculas que se unen a los TLR como ARN que se unen a TLR 7, TLR 8 y/o TLR 9.

Entre los ejemplos de adyuvantes útiles también se incluyen CpG modificados químicamente (p. ej., CpR, Idera), análogos de ARNdc como poli(I:C) y derivados de los mismos (p. ej., AmpliGen®, Hiltonol®, poli-(ICLC), poli(IC-R), poli(I:C12U), ARN o ADN bacteriano sin CpG, así como anticuerpos y moléculas pequeñas inmunoactivas como ciclofosfamida, sunitinib, Bevacizumab®, celebrex, NCX-4016, sildenafil, tadalafilo, vardenafilo, sorafenib, temozolomida, temsirolimús, XL-999, CP-547632, pazopanib, VEGF Trap, ZD2171, AZD2171, anti-CTLA4, otros anticuerpos que reconocen estructuras clave del sistema inmunitario (p. ej., anti-CD40, anti-TGF-beta, anti-receptor TNF-alfa) y SC58175, que pueden actuar de forma terapéutica y/o como adyuvantes. Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y de aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas versadas en la técnica sin demasiada experimentación.

Los adyuvantes preferidos son anti-CD40, imiquimod, resiquimod, GM-CSF, ciclofosfamida, sunitinib, bevacizumab, interferón-alfa, oligonucleótidos CpG y derivados, poli-(I:C) y derivados, ARN, sildenafil, y formulaciones de partículas con PLG o virosomas.

En una forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod, resiquimod e interferón-alfa.

En una forma de realización preferida la composición farmacéutica conforme a la invención el adyuvante es seleccionado del grupo consistente en factores estimuladores de colonias, como el factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, sargramostim), ciclofosfamida, imiquimod y resiquimod. En otra forma de realización preferida de la composición farmacéutica conforme a la invención, el adyuvante es ciclofosfamida, imiquimod o resiquimod. Los adyuvantes más preferidos son: Montanide IMS 1312, Montanide ISA 206, Montanide ISA 50V, Montanide ISA-51, poli-ICLC (Hiltonol®) y AcM anti-CD40 o combinaciones de los anteriores.

Esta composición está destinada a la administración parenteral, como por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o bien para la administración oral. Para ello, los péptidos y opcionalmente otras moléculas se disuelven o se suspenden en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente acuoso. Además, la composición puede contener excipientes, tales como tampones, aglutinantes, disgregantes, diluyentes, sabores, lubricantes, etc. Los péptidos también se pueden administrar junto con sustancias inmunoestimuladoras, como citocinas. En una composición tal se puede usar una amplia lista de excipientes, como por ejemplo, los tomados de A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, (Kibbe, 2000). La composición se puede utilizar para la prevención, profilaxis y/o tratamiento de enfermedades adenomatosas o cancerosas. Las formulaciones preferidas se pueden encontrar en EP2112253, por ejemplo.

Es importante tener presente que la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna conforme a la invención ataca el cáncer en diferentes estadios celulares y en diferentes estadios de desarrollo. Además, se atacan diferentes vías de señalización relacionadas con el cáncer. Esto supone una ventaja con respecto a las vacunas que solo van dirigidas contra una o pocas dianas, que pueden permitir que el tumor se adapte con facilidad al ataque (evasión tumoral). Además, no todos los tumores expresan el mismo patrón de antígenos, por lo que la combinación de varios péptidos asociados a tumor asegura que el tumor en cuestión contenga al menos alguna de las dianas. La composición ha sido diseñada de modo tal que se espera que exprese varios de los antígenos y abarque varias vías independientes necesarias para el crecimiento y el mantenimiento del tumor. Así pues, la vacuna puede ser utilizada con facilidad en la forma ya preparada (*off-the-shelf*) para una población de pacientes más amplia. Esto significa que no será preciso ninguna otra evaluación de biomarcadores de la expresión de los antígenos aparte del tipado del HLA para seleccionar a los pacientes que acabarán siendo tratados con la vacuna, pero que, aun así, está asegurado que la respuesta inmunitaria estimulada atacará simultáneamente a varias dianas, lo que es importante para la eficacia (Banchereau et al., 2001; Walter et al., 2012).

Tal y como se emplea en la presente memoria, el término «soporte» se refiere a una molécula que se une específicamente a un determinante (p. ej., antigénico). En una forma de realización, un soporte es capaz de dirigir la entidad a la que se ha unido (p. ej., una (segunda) porción unida a antígeno) a un sitio diana, por ejemplo a un tipo específico de célula tumoral o de estroma tumoral portador del determinante antigénico (p. ej., el complejo de un péptido conforme a la presente solicitud). En otra forma de realización un soporte es capaz de activar la señalización mediante su antígeno diana, por ejemplo un antígeno del complejo del receptor del linfocito T. Los soportes incluyen, entre otros, anticuerpos y fragmentos de los mismos, los dominios de unión a antígeno de un anticuerpo, que comprenden una región variable de la cadena pesada del anticuerpo y otra región variable de la cadena ligera del anticuerpo, proteínas de unión que comprenden al menos un motivo repetido de anquirina y moléculas con un solo dominio de unión a antígeno (SDAB), aptámeros, TCR (solubles) y células (modificadas) como linfocitos T alógenos o autógenos. Para evaluar si una molécula es un soporte que se une a una diana, se pueden efectuar ensayos de

unión.

Unión «específica» significa que el soporte se une al complejo péptido-MHC de interés mejor que a otros complejos de péptido-MHC naturales, hasta el punto de que un soporte dotado de una molécula activa que es capaz de matar una célula portadora de la diana específica no puede matar otra célula que carezca de esa diana específica aunque presente otro u otros complejos péptido-MHC. La unión a otros complejos péptido-MHC es irrelevante si el péptido del complejo péptido-MHC que reacciona de forma cruzada no es natural, es decir, no deriva del peptidoma-HLA humano. Las pruebas para evaluar la destrucción de las células diana son perfectamente conocidas en la materia. Deben realizarse con células diana (células primarias o estirpes celulares) con una presentación intacta de péptido-MHC, o células cargadas con péptidos de tal modo que se alcancen los niveles de péptido-MHC naturales.

Cada soporte puede comprender un marcador que permita detectarlo una vez unido mediante la determinación de la presencia o la ausencia de una señal generada por dicho marcador. Por ejemplo, el soporte puede ser marcado con un colorante fluorescente o cualquier otra molécula marcadora celular adecuada. Tales moléculas marcadoras son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo en el caso del marcador por fluorescencia, como el facilitado por un colorante fluorescente, la visualización del aptámero unido se puede lograr mediante microscopía de fluorescencia o de barrido láser o por citometría de flujo.

Cada soporte se puede conjugar con una segunda molécula activa, como por ejemplo IL-21, anti-CD3 o anti-CD28.

Para más información sobre los soportes polipeptídicos véase por ejemplo el apartado de información general de WO2014/071978A1 y las referencias citadas en la misma.

Los aptámeros (véase por ejemplo WO 2014/191359 y la bibliografía citada en ella) son moléculas de ácidos nucleicos monocatenarios cortas, que se pueden plegar hasta adoptar estructuras tridimensionales definidas y que reconocen estructuras diana específicas. Parecen ser alternativas adecuadas para el desarrollo de terapias dirigidas. Los aptámeros han demostrado su unión selectiva a una gama de dianas complejas con elevada afinidad y especificidad.

En la pasada década han sido descubiertos aptámeros que reconocen moléculas situadas en la superficie celular que constituyen un medio para el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas. La toxicidad y la inmunogenicidad de los aptámeros es, hasta donde se sabe, prácticamente nula, por lo que son candidatos prometedores a aplicaciones biomédicas. Y son aptámeros, por ejemplo aptámeros que reconocen el antígeno de membrana específico de la próstata, los que han sido empleados con éxito en terapias dirigidas y han demostrado su funcionalidad en modelos de xenoinjerto *in vivo*. Además, se han descubierto aptámeros que reconocen estirpes de células tumorales específicas.

Es posible seleccionar aptámeros de ADN para desvelar propiedades de reconocimiento de amplio espectro contra varias células cancerosas, y particularmente las derivadas de tumores sólidos, en tanto que las células sanas primarias y no oncogénicas no son reconocidas. Si los aptámeros descubiertos reconocieran no solo un subtipo de tumor concreto sino que interaccionaran con una serie de tumores, se convertirían en una herramienta aplicable para el diagnóstico y la terapéutica de amplio espectro.

Además, las investigaciones de su unión a células mediante la citometría de flujo han demostrado que los aptámeros presentan una excelente afinidad aparente en la escala nanomolar.

Los aptámeros resultan útiles para fines diagnósticos y terapéuticos. Además, ha sido posible demostrar que algunos aptámeros son captados por las células tumorales y pueden actuar, así como vehículos moleculares para la administración dirigida de agentes antineoplásicos como ARNs en las células tumorales.

Se pueden seleccionar aptámeros que vayan dirigidos contra dianas complejas tales como células y tejidos y complejos del péptido que comprendan, y que preferiblemente consistan en, una secuencia acorde con la SEQ ID N.º 82, conforme con la presente invención con la molécula MHC, mediante la técnica cell-SELEX (acrónimo de *Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*, Evolución sistemática de los ligandos mediante enriquecimiento exponencial).

El péptido de la presente invención puede usarse para generar y desarrollar anticuerpos específicos contra complejos MHC/péptido. Estos pueden ser utilizados como terapia, dirigiendo toxinas o sustancias radiactivas contra el tejido enfermo. Otra aplicación de estos anticuerpos consistiría en dirigir radionúclidos contra el tejido enfermo en aplicaciones de diagnóstico por la imagen como la TEP. Este uso puede ayudar a detectar metástasis pequeñas o determinar el tamaño y la ubicación precisa de los tejidos enfermos.

Por tanto, existe otro aspecto de la invención que proporciona un método para producir un anticuerpo recombinante que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, comprendiendo dicho método: inmunizar un mamífero no humano genéticamente modificado que comprenda células que expresen dicho complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I o II con una forma soluble de una molécula MHC de clase I unida a dicho antígeno restringido a HLA; aislamiento de moléculas de ARNm a partir de células productoras de anticuerpos de dicho

mamífero no humano; producción de una fagoteca que contenga moléculas proteicas codificadas por dichas moléculas de ARNm; y aislamiento de al menos un fago de dicha fagoteca, en que al menos ese fago contenga dicho anticuerpo que se une específicamente al citado complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I unido con dicho antígeno restringido a HLA.

- 5 Existe otro aspecto más de la invención que proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un complejo mayor de histocompatibilidad humano (MHC) de clase I que forma un complejo con un antígeno restringido a HLA, en el que el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo biespecífico y/o un anticuerpo quimérico.

- 10 En WO 03/068201, WO 2004/084798, WO 01/72768, WO 03/070752, y en publicaciones (Cohen et al., 2003a; Cohen et al., 2003b; Denkberg et al., 2003) se dan a conocer métodos para producir tales anticuerpos y complejos mayores de histocompatibilidad de clase I monocatenarios, así como otras herramientas para la producción de tales anticuerpos, que a efectos de la presente invención se incorporan todos de forma explícita en su integridad.

Preferiblemente el anticuerpo se une al complejo con una afinidad de unión inferior a 20 nanomolar, preferentemente inferior a 10 nanomolar, lo cual se considera «específico» en el contexto de la presente invención.

- 15 La presente invención se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 82.

La presente invención se refiere, además, al péptido acorde con la presente invención que tiene la capacidad de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad humana (MHC) de clase I o II.

- 20 La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la invención, en que el incluye enlaces no peptídicos.

La presente invención se refiere, además, a los péptidos acordes con la presente invención, en que dichos péptidos son parte de una proteína de fusión, en particular comprenden aminoácidos N-terminales de la cadena invariable asociada al antígeno HLA-DR (II), o en que el péptido está fusionado con (o en la secuencia de) un anticuerpo, como por ejemplo, un anticuerpo que es específico de células dendríticas.

- 25 Otra realización de la presente invención se refiere a un péptido no presente en la naturaleza, en que el péptido consiste en una secuencia de aminoácidos acorde con las SEQ ID N.º 82 y ha sido producida sintéticamente (p. ej., sintetizada) en forma de una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Los métodos para la síntesis de péptidos son bien conocidos en la materia. Las sales del péptido acorde con la presente invención difieren sustancialmente de los péptidos en su estado o estados *in vivo*, puesto que los péptidos no se hallan en forma de sal en las condiciones *in vivo*. De la forma artificial de sal del péptido depende su solubilidad, en particular en el contexto de composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos, como por ejemplo, las vacunas peptídicas que se dan a conocer en la presente memoria. Para que los péptidos se puedan suministrar de modo eficaz al sujeto que se va a tratar, es preciso que el péptido o péptidos tengan la suficiente solubilidad, por lo menos sustancial. Preferiblemente, las sales de los péptidos deben ser sales farmacéuticamente aceptables. Estas sales acordes con la invención incluyen sales alcalinas y alcalinotérricas como las sales de la serie de Hofmeister que comprenden aniones como PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- , ClO_4^- , I^- , SCN^- y cationes como NH_4^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Cs^+ , Li^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Ba^{2+} . En concreto, las sales se seleccionan entre las siguientes: $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, NH_4Cl , NH_4Br , NH_4NO_3 , NH_4ClO_4 , NH_4I , NH_4SCN , Rb_3PO_4 , Rb_2HPO_4 , RbH_2PO_4 , Rb_2SO_4 , $\text{Rb}_4\text{CH}_3\text{COO}$, Rb_4Cl , Rb_4Br , Rb_4NO_3 , Rb_4ClO_4 , Rb_4I , Rb_4SCN , K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KCH_3COO , KCl , KBr , KNO_3 , KClO_4 , KI , KSCN , Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2SO_4 , NaCH_3COO , NaCl , NaBr , NaNO_3 , NaClO_4 , NaI , NaSCN , ZnCl_2 , Cs_3PO_4 , Cs_2HPO_4 , CsH_2PO_4 , Cs_2SO_4 , CsCH_3COO , CsCl , CsBr , CsNO_3 , CsClO_4 , CsI , CsSCN , Li_3PO_4 , Li_2HPO_4 , LiH_2PO_4 , Li_2SO_4 , LiCH_3COO , LiCl , LiBr , LiNO_3 , LiClO_4 , LiI , LiSCN , Cu_2SO_4 , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Mg_2HPO_4 , $\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Mg_2SO_4 , $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$, MgI_2 , $\text{Mg}(\text{SCN})_2$, MnCl_2 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, Ca_2HPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CaCl_2 , CaBr_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$, CaI_2 , $\text{Ca}(\text{SCN})_2$, $\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_2$, Ba_2HPO_4 , $\text{Ba}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, BaSO_4 , $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, BaCl_2 , BaBr_2 , $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$, BaI_2 y $\text{Ba}(\text{SCN})_2$.

En particular se prefieren el NH acetato, MgCl_2 , KH_2PO_4 , Na_2SO_4 , KCl , NaCl y CaCl_2 , como por ejemplo, las sales de cloruro o acetato (trifluoroacetato).

- 50 En general, los péptidos (al menos aquellas que contiene enlaces peptídicos entre los residuos de aminoácidos) pueden ser sintetizados, p. ej., utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida por el método de Fmoc-poliámida, como muestra Lu et al. (Lukas et al., 1981) y las referencias que aparecen en el mismo. La protección temporal del grupo N-amino se consigue con el grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La escisión repetida de este grupo protector muy sensible al pH básico se lleva a cabo con piperidina al 20% en N,N-dimetilformamida. Los grupos funcionales de las cadenas laterales se podrían proteger si se transformaran en éteres de butilo (en el caso de la serina, treonina y tirosina), ésteres de butilo (en el caso del ácido glutámico y aspártico), derivados butiloxycarbonílicos (en el caso de la lisina y la histidina), derivados tritilados (en el de la cisteína) y derivados 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonílicos (en el de la arginina). Cuando los residuos C-terminales son glutamina o asparragina se utiliza el grupo 4,4'-dimetoxibencidrido para proteger los grupos funcionales amido de la cadena lateral. El soporte en fase sólida se basa en un polímero de polidimetil-acrilamida constituido por los tres monómeros

siguientes: dimetilacrilamida (monómero estructural), bisacriloletilendiamina (entrelazante) y acrilolsarcosina metiléster (funcionalizador). El agente escindible que mantiene unido el péptido a la resina es un derivado del ácido 4-hidroximetilfenoxiacético, sensible a pH ácido. Todos los derivados de aminoácidos se añaden en forma de derivados anhídridos simétricos preformados salvo la asparragina y la glutamina, que se añaden utilizando un procedimiento de acoplamiento inverso con N,N-diciclohexil-carbodiimida/1-hidroxibenzotriazol. Todas las reacciones de acoplamiento y desprotección se controlan con procedimientos de ensayo con ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico o isotina. Una vez completada la síntesis, los péptidos se separan del soporte de resina y al mismo tiempo se eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales mediante el tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% con una mezcla de capturadores (*scavengers*) al 50%. Los capturadores utilizados normalmente son etanditiol, fenol, anisol y agua, dependiendo de la elección exacta de los aminoácidos constituyentes del péptido que se está sintetizando. La síntesis de péptidos también es posible combinando metodologías de fase sólida y de fase en solución (véase por ejemplo (Bruckdorfer et al., 2004) y las referencias citadas en la misma).

El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación en vacío y se procede a la trituración con dietiléter para obtener el péptido bruto. Todos los capturadores se eliminan con un procedimiento de extracción simple que con la liofilización de la fase acuosa proporciona el péptido bruto exento de ellos. Los reactivos para la síntesis de péptidos se pueden conseguir en general por ejemplo de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido).

La purificación puede llevarse a cabo mediante una sola o una combinación de técnicas como la recristalización, cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por interacción hidrofóbica, y (normalmente) cromatografía de líquidos de alto rendimiento con fase inversa utilizando, p. ej., la separación con gradiente de acetónitrilo/agua.

La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico, que codifica los péptidos acordes con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al ácido nucleico acorde con la presente invención que es ADN, ADNc, APN, ARN o combinaciones de los anteriores.

La presente invención se refiere, además, a un vector de expresión que expresa un ácido nucleico acorde con la presente invención.

La presente invención se refiere, además, a un péptido acorde con la presente invención, un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la presente invención para el uso en medicina, en concreto para el tratamiento del cáncer de ovario.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico acorde con la presente invención o un vector de expresión acorde con la invención.

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedadora acorde con la presente invención que es una célula presentadora de antígeno, y preferiblemente una célula dendrítica.

La presente invención se refiere, además, a un método para producir un péptido acorde con la presente invención, que comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la presente invención y el aislamiento del péptido de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la presente invención en que el antígeno es cargado en moléculas de MHC de clase I expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno mediante la puesta en contacto de una cantidad de antígeno suficiente con una célula presentadora de antígeno.

La presente invención se refiere, además, al método acorde con la invención, en que la célula presentadora de antígeno comprende un vector de expresión que expresa dicho péptido que contiene la SEQ ID N.º 82.

La presente invención se refiere, además, a linfocitos T activados, producidos con el método acorde con la presente invención, que reconocen selectivamente una célula que expresa un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos conforme a la presente invención.

Se da a conocer un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos acordes con la presente invención, comprendiendo el método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T conforme a la presente invención.

La presente invención se refiere, además, al uso en medicina del péptido descrito, de un ácido nucleico acorde con la presente invención, de un vector de expresión acorde con la presente invención, de una célula acorde con la presente invención, o de un linfocito T citotóxico activado acorde con la presente invención. La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la presente invención en el que el medicamento es activo contra el cáncer.

La presente invención se refiere, además, a un uso conforme a la presente invención en el que dicho medicamento

es una vacuna.

La presente invención concierne además al uso acorde con la presente invención, en que dichas células tumorales son células de cáncer de ovario o células de otro tumor sólido o hematológico como el cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer de riñón, cáncer de colon o recto y leucemia.

5 El término «anticuerpo» o «anticuerpos» se utiliza en la presente memoria en sentido amplio e incluye tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas o «enteras», el término «anticuerpos» también incluye los fragmentos (p. ej., fragmentos CDRs, Fv, Fab y Fc) o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanizadas de las mismas, siempre que exhiban alguna de las propiedades deseadas (p. ej., unión específica de un polipéptido marcador del cáncer de ovario que exprese un gen
10 marcador del cáncer con un nivel elevado, y/o que inhiba la actividad de un polipéptido marcador del cáncer de ovario conforme a la invención).

Si es posible los anticuerpos de la invención se podrán adquirir de fuentes comerciales. Los anticuerpos de la invención también se pueden fabricar con métodos consabidos. La persona versada en la técnica entiende que para fabricar los anticuerpos de la invención se pueden emplear tanto polipéptidos marcadores enteros de cáncer de ovario, como fragmentos de los mismos. El polipéptido necesario para generar un anticuerpo de la invención se puede purificar parcial o completamente de una fuente natural o se puede producir con técnicas de ADN recombinante.
15

Por ejemplo, un ADNc que codifique un péptido acorde con la presente invención, como un péptido acorde con la SEQ ID N.º 89, se puede expresar en células procariotas (p. ej., bacterias) o eucariotas (p. ej., células de levadura, insecto o mamífero), a partir de las cuales se purificará la proteína recombinante con la que se generará una preparación de anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente al polipéptido marcador del cáncer de ovario utilizado para generar el anticuerpo acorde con la invención.
20

Una persona versada en la técnica sabrá que la generación de dos o más conjuntos diferentes de anticuerpos monoclonales o policlonales maximiza la probabilidad de obtener un anticuerpo dotado de la especificidad y la afinidad necesarias para el uso previsto (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, técnicas de imagen *in vivo*, tratamiento con inmunotoxinas). Los anticuerpos son analizados para buscar la actividad deseada con métodos conocidos, de acuerdo con el fin previsto para los anticuerpos (p. ej., ELISA, inmunohistoquímica, inmunoterapia, etc.; para más detalles sobre la generación y el análisis de anticuerpos, véase por ejemplo, Greenfield, 2014 (Greenfield, 2014). Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser analizados con pruebas ELISA, inmunotransferencia (*Western blot*), tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido de cáncer congelados o fijados en formol. Después de la caracterización inicial *in vitro*, los anticuerpos destinados a uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* se analizan con métodos de ensayo clínicos conocidos.
25
30

El término «anticuerpo monoclonal» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población notablemente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones posiblemente naturales que pueden estar presentes en pequeño número. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos «quiméricos» en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que exhiban la actividad antagonista deseada (N.º pat. de EE.UU. 4.816.567).
35
40

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden preparar con métodos basados en hibridomas. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador adecuado es vacunado con un agente inmunizante que estimula a los linfocitos para que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Otra alternativa consiste en inmunizar los linfocitos *in vitro*.
45

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar con métodos de ADN recombinante, como los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado con procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón).
50

Los métodos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo con técnicas ordinarias conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la digestión se puede realizar con papaína. Ejemplos de la digestión con papaína aparecen descritos en WO 94/29348 y en la Pat. de EE. UU. N.º 4.342.566. La digestión de anticuerpos con papaína normalmente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno dotado de un sitio de unión al antígeno, así como un fragmento residual Fc. El tratamiento con pepsina da como resultado un fragmento F(ab')₂ y un fragmento pFc'.
55

Los fragmentos de anticuerpo, estén unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones,

5 sustituciones y otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o de residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad de los fragmentos no se vea significativamente alterada o afectada respecto al anticuerpo o el fragmento de anticuerpo intactos. Estas modificaciones pueden ofrecer alguna propiedad adicional, como eliminar o añadir aminoácidos capaces de establecer puentes de sulfuro para aumentar la biolongevidad, alterar las características de secreción, etc. En cualquier caso el fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, como actividad de unión, regulación de unión al dominio de unión, etc. Las regiones activas o funcionales del anticuerpo pueden ser identificadas por mutagenia de una región específica de la proteína, seguida por la expresión y el análisis del polipéptido expresado. Tales métodos son obvios para toda persona versada en la técnica y pueden incluir la mutagenia dirigida del ácido nucleico que codifica el fragmento de anticuerpo.

10 Los anticuerpos de la invención también pueden comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (p. ej., de ratón) son formas químicas de inmunoglobulinas, de cadenas de inmunoglobulina o de fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab' u otras secuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una pequeña secuencia derivada de inmunoglobulinas no humanas. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que está dotada de la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales (FR) del fragmento Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no están presentes ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en las secuencias estructurales. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá prácticamente la totalidad de al menos uno, y normalmente de dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones CDR corresponderán a las de la inmunoglobulina no humana y todas o casi todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado idealmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos de origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos con frecuencia son denominados residuos «importados», que normalmente se extraen del dominio variable «importado». La humanización se puede llevar a cabo básicamente sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por tanto, tales anticuerpos «humanizados» son anticuerpos quiméricos (Pat. de EE.UU. N.º 4.816.567), en los que una parte notablemente más pequeña que un dominio variable humano intacto ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

Se pueden emplear animales transgénicos (p. ej., ratones) que tras la inmunización sean capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos sin producir inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes germinales provoca la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. También se pueden producir anticuerpos humanos en fagotecas.

Los anticuerpos de la invención se administran preferiblemente a un sujeto incorporándolos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente a la formulación se le añade una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para que sea isotónica. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Es preferible que el pH de la solución está situado aproximadamente entre 5 y 8, y más preferiblemente entre 7 y 7,5 aproximadamente. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación prolongada como matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contengan el anticuerpo, en matrices con forma modelada, p. ej., películas, liposomas o micropartículas. Para las personas versadas en la técnica será evidente que son preferibles ciertos vehículos dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y de la concentración del anticuerpo que se va a administrar.

Los anticuerpos se pueden administrar al sujeto, al paciente o a las células mediante inyección (intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, etc.), o con otros métodos como la infusión que aseguren su liberación efectiva en el torrente sanguíneo. Los anticuerpos también se pueden administrar por vía intratumoral o peritumoral para ejercer un efecto terapéutico a la par sistémico y local. Se prefiere la inyección local o intravenosa.

Las dosis y pautas de administración más adecuadas se pueden determinar empíricamente; la toma de decisiones a este respecto forma parte de los conocimientos de la materia. Las personas versadas en la materia saben que la dosis de anticuerpos a administrar depende, por ejemplo, del sujeto que va a recibir el anticuerpo, la vía de administración, el tipo concreto de anticuerpo y de otros medicamentos que se le estén administrando. La dosis diaria típica de anticuerpo cuando se utiliza solo puede oscilar entre 1 µg/kg y 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los susodichos factores. Tras la administración del anticuerpo, preferiblemente para tratar el

cáncer de ovario, la eficacia del anticuerpo terapéutico se puede evaluar de varios modos bien conocidos por el médico especialista. Por ejemplo se puede controlar el tamaño, el número y/o la distribución del cáncer de pulmón en el sujeto receptor del tratamiento utilizando técnicas de imagen oncológicas estándar. Todo anticuerpo administrado con fines terapéuticos que detenga el crecimiento del tumor, reduzca su extensión y/o impida la aparición de nuevos tumores en contraste con la evolución de la enfermedad si no se produjera la administración del anticuerpo, es un anticuerpo eficaz para el tratamiento del cáncer de pulmón.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir un receptor de linfocito T soluble (sTCR) que reconoce un complejo de péptido-MHC específico. Dichos receptores de linfocitos T solubles se pueden generar a partir de clones de linfocitos T específicos, cuya afinidad se puede incrementar por mutagenia dirigida a las regiones determinantes de complementariedad. Para la selección del receptor de linfocito T se puede utilizar una fagoteca (US 2010/0113300, (Liddy et al., 2012)). A fin de estabilizar los receptores de linfocito T en la fagoteca y en caso de uso práctico como fármaco, las cadenas alfa y beta se pueden enlazar por ejemplo mediante enlaces disulfuro no nativos, otros enlaces covalentes (receptor de linfocito T monocatenario), o mediante dominios de dimerización (Boulter et al., 2003; Card et al., 2004; Willcox et al., 1999). El receptor de linfocito T se puede enlazar con toxinas, fármacos, citocinas (véase, por ejemplo, US 2013/0115191), y con dominios que recluten células efectoras como un dominio anti-CD3, etc., con el fin de ejecutar funciones particulares en células diana. Asimismo, se puede expresar en linfocitos T destinados a la transferencia a un receptor. Se puede encontrar más información en WO 2004/033685A1 y WO 2004/074322A1. En WO 2012/056407A1 se describe una combinación de sTCR. Otros métodos de producción se revelan en WO 2013/057586A1.

Además, los péptidos y/o los TCR o anticuerpos u otras moléculas de unión de la presente invención se pueden utilizar para verificar el diagnóstico histopatológico de cáncer basado en una muestra de biopsia.

Los anticuerpos o TCR también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, el anticuerpo se marca con un radionúclido (como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) de modo que el tumor puede ser localizado con inmunogammagrafía. En una forma de realización, anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a los dominios extracelulares de dos o más dianas de una proteína seleccionada del grupo consistente en las susodichas proteínas, y el valor de afinidad (Kd) es inferior a $1 \times 10 \mu\text{M}$.

Los anticuerpos para uso diagnóstico pueden ser marcados con sondas adecuadas para posibilitar la detección con diferentes métodos ópticos. Los métodos para la detección de sondas incluyen, entre otros, microscopía de fluorescencia, óptica, confocal y electrónica; resonancia magnética y espectroscopía; radioscopia, tomografía computadorizada y tomografía por emisión de positrones. Las sondas adecuadas incluyen, entre otras, fluoresceína, rodamina, eosina y otros fluoróforos, radioisótopos, oro, gadolinio y otros lantánidos, hierro paramagnético, flúor-18 y otros radionúclidos emisores de positrones. Además, las sondas pueden ser bi o multifuncionales y ser detectables por más de uno de los métodos enumerados. Los anticuerpos pueden marcarse directa o indirectamente con dichas sondas. La fijación de sondas a los anticuerpos incluye la unión covalente de la sonda, la incorporación de la sonda en el anticuerpo, y la unión covalente de un compuesto quelante para unir la sonda, entre otros métodos consabidos en la técnica. Para las técnicas de inmunohistoquímica, la muestra de tejido patológico puede ser fresca o congelada o puede estar incluida en parafina y fijada con un conservante como formol. El corte fijado o incluido que contiene la muestra se pone en contacto con un anticuerpo primario marcado y un anticuerpo secundario, de modo que el anticuerpo se emplea para detectar la expresión *in situ* de las proteínas.

Otro aspecto de la presente invención incluye un método *in vitro* para producir linfocitos T activados, comprendiendo dicho método la puesta en contacto en condiciones *in vitro* de linfocitos T con moléculas MHC humanas cargadas con antígeno expresadas en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada por tiempo suficiente para activar los linfocitos T de una manera específica de antígeno, siendo el antígeno un péptido conforme a la invención. Preferentemente se emplea una cantidad suficiente del antígeno con una célula presentadora de antígeno.

Preferiblemente, la célula de mamífero carece del transportador de péptidos TAP o bien este se presenta en un nivel reducido o funciona defectuosamente. Las células adecuadas que carecen del transportador de péptidos TAP incluyen las células T2, RMA-S y de *Drosophila*. TAP es el transportador relacionado con el procesamiento de los antígenos.

La estirpe celular humana deficiente en carga de péptidos T2 está disponible en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EE.UU. con el N.º de catálogo CRL 1992; la estirpe de células de *Drosophila* Schneider line 2 está disponible en la ATCC con el N.º de catálogo CRL 19863; la estirpe de células de ratón RMA-S está descrita en Ljunggren y cols. (Ljunggren and Karre, 1985).

Preferentemente, la célula hospedadora no expresa sustancialmente moléculas MHC de clase I antes de la transfección. También es preferible que la célula estimuladora exprese una molécula importante que proporcione una señal coestimuladora para los linfocitos T, como B7.1, B7.2, ICAM-1 y LFA 3. Las secuencias de ácidos nucleicos de numerosas moléculas MHC de clase I y de las moléculas co-estimuladoras están disponibles públicamente en las bases de datos GenBank y EMBL.

Si se utiliza como antígeno un epítipo de MHC de clase I, los linfocitos T serán linfocitos T CD8-positivos.

Si una célula presentadora de antígeno es transfectada para expresar un epítipo de ese tipo, la célula comprenderá preferentemente un vector de expresión que exprese un péptido que contenga SEQ ID N.º 82.

Existen otros métodos para generar linfocitos T *in vitro*. Por ejemplo, emplear linfocitos autólogos infiltrados en el tumor para generar los CTL. Plebanski et al. (Plebanski et al., 1995) utilizan linfocitos de sangre periférica autóloga (PLB) para la preparación de los linfocitos T. Asimismo, es posible la producción de linfocitos T autólogos estimulando células dendríticas con el péptido o el polipéptido, o a través de la infección con virus recombinantes. También se pueden usar linfocitos B para la producción de linfocitos T autólogos. Asimismo, para la preparación de linfocitos T autólogos se pueden usar macrófagos estimulados con péptido o polipéptido o infectados con virus recombinantes. S. Walter y cols. (Walter et al., 2003) describen la estimulación *in vitro* de linfocitos T con células presentadoras de antígeno (aAPC), que también es una forma adecuada de generar linfocitos T contra el péptido de elección. En la presente invención, las aAPC se generaron adhiriendo complejos MHC:péptido preformados a la superficie de partículas de poliestireno (microperlas) con biotina:estreptavidina. Este sistema permite controlar con exactitud la densidad de MHC en las aAPC, lo que permite desencadenar respuestas de linfocitos T específicas de antígeno con una avidez alta o baja a partir de muestras de sangre, de una forma selectiva y altamente eficaz. Además de los complejos MHC:péptido, las aAPC deben incorporar acopladas en su superficie otras proteínas con actividad co-estimuladora como anticuerpos anti-CD28. Tales sistemas de aAPC también precisan a menudo el concurso de factores solubles adecuados, por ejemplo citocinas, como la interleucina-12.

Para la preparación de linfocitos T también se pueden utilizar células alogénicas; en WO 97/26328 se describe detalladamente un método. Por ejemplo, además de células de *Drosophila* y de células T2, para presentar antígenos se pueden usar otras células tales como células CHO, células de insecto infectadas con baculovirus, bacterias, levaduras y células diana infectadas con virus vacunal. Asimismo se pueden usar virus vegetales (véase, por ejemplo, Porta y cols. (Porta et al., 1994) que describen el desarrollo del virus del mosaico del chicharo como una sistema de alto rendimiento para la presentación de péptidos foráneos.

Los linfocitos T activados que están dirigidos contra los péptidos de la invención son útiles como tratamiento. Así pues, otro aspecto de la invención proporciona linfocitos T activados obtenibles por los susodichos métodos de la invención.

Los linfocitos T activados producidos con el susodicho método reconocerán selectivamente una célula que expresa de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 82.

Preferiblemente el linfocito T reconoce la célula interactuando a través de su TCR con el complejo HLA/péptido, por ejemplo uniéndosele. Los linfocitos T son útiles en un método para destruir células diana en un paciente cuyas células diana expresen de forma aberrante un polipéptido que comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención y al cual se le administre un número eficaz de linfocitos T activados. Los linfocitos T que se le administren pueden proceder del mismo paciente y ser activados del modo antes descrito, es decir, ser linfocitos T autólogos. Otra alternativa consiste en que los linfocitos T no sean del paciente y procedan de otro individuo. Por supuesto, es preferible que dicho individuo esté sano. Por «individuo sano» los inventores entienden un individuo que goce de buen estado de salud general, preferentemente con un sistema inmunitario competente y, más preferentemente, no sufra ninguna enfermedad que pueda detectarse mediante análisis.

En condiciones *in vivo*, las células diana de los linfocitos T CD8-positivos acordes con la presente invención pueden ser células del tumor (que a veces expresan MHC de clase II) y/o células estromales circundantes al tumor (células tumorales) (que en ocasiones también expresan MHC de clase II; (Dengjel et al., 2006)).

Los linfocitos T de la presente invención se pueden usar como principios activos de una composición terapéutica. Por tanto, la invención también proporciona un método para destruir células diana de un paciente que expresan de forma aberrante un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, comprendiendo dicho método la administración al paciente de un número eficaz de linfocitos T como los definidos arriba.

Por «expresado de forma aberrante» los inventores también quieren decir que el polipéptido está sobreexpresado en comparación con los niveles normales de expresión o que el gen está reprimido en el tejido del cual deriva el tumor pero sí se expresa en el tumor. Por «sobreexpresado» los inventores quieren decir que el nivel del polipéptido es como mínimo 1,2 veces mayor que el nivel en el tejido normal; preferiblemente como mínimo 2 veces mayor, y más preferiblemente como mínimo 5 o 10 veces mayor que el del tejido normal.

Los linfocitos T se pueden obtener por métodos conocidos en la materia, como, por ejemplo, los antes descritos.

Los protocolos para la llamada transferencia de linfocitos T a un receptor son perfectamente conocidos. Se pueden encontrar revisiones en: Gattioni y cols. y Morgan y cols. (Gattioni et al., 2006; Morgan et al., 2006).

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de los péptidos formando un complejo con MHC para generar un receptor de linfocito T cuyo ácido nucleico se clona y se introduce en una célula hospedadora, preferiblemente un linfocito T. Ese linfocito T modificado se puede entonces transferir a un paciente como tratamiento contra el cáncer.

Cualquier molécula de la invención, ya sea péptido, ácido nucleico, anticuerpo, vector de expresión, célula, linfocito T activado, receptor de linfocito T o el ácido nucleico que lo codifique es útil para el tratamiento de trastornos caracterizados por células que eluden la respuesta inmunitaria. Por consiguiente, cualquier molécula de la presente invención puede ser utilizada como medicamento o en la fabricación de un medicamento. La molécula puede ser utilizada sola o combinada con otra molécula o moléculas de la invención o con cualquier o cualesquier moléculas conocidas.

Puesto que los polipéptidos subyacentes de los péptidos dados a conocer y como los citados en las tablas anteriores se expresan con profusión en el cáncer de ovario, y se expresan en niveles sumamente bajos en las células normales, sería preferible que en la estrategia terapéutica se adoptaran como dianas los péptidos derivados de los productos proteicos de los genes siguientes:

La presente invención también proporciona un medicamento que es útil para el tratamiento del cáncer, en particular del cáncer de ovario y de otras neoplasias malignas.

La presente invención también contempla un equipo que comprende:

- (a) un envase con una composición farmacéutica como la descrita más arriba, en forma de solución o liofilizada;
- (b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada; y
- (c) opcionalmente, (I) instrucciones de uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada.

El equipo puede comprender, además, uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (VII) una jeringa. El envase es preferiblemente un frasco, un vial, una jeringa o un tubo de ensayo; puede ser un envase multiusos. Se prefiere que la composición farmacéutica esté liofilizada.

Los equipos de la presente invención comprenden, preferiblemente, una formulación liofilizada de la presente invención en un envase adecuado e instrucciones para su reconstitución y/o uso. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (p. ej., viales con doble cámara), jeringas (como jeringas con doble cámara) y tubos de ensayo. El envase puede estar formado por materiales diversos como vidrio o plástico. Preferiblemente el kit y/o envase contienen o van acompañados de instrucciones de reconstitución y/o uso. Por ejemplo, el prospecto puede indicar que la formulación liofilizada debe reconstituirse para obtener ciertas concentraciones de péptidos como las descritas en páginas precedentes. La etiqueta puede indicar, además, que la formulación puede administrarse o está destinada a la administración subcutánea.

El envase que contiene la formulación puede ser un vial multiuso que permita varias administraciones (p. ej., de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituída. El equipo puede comprender, además, un segundo envase que contenga un diluyente adecuado (p. ej., una solución de bicarbonato sódico).

Después de mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final del péptido en la formulación reconstituída es preferiblemente como mínimo de 0,15 mg/ml/péptido (=75 µg) y preferiblemente como máximo de 3 mg/ml/péptido (=1500 µg). El equipo puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, tales como otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

Los equipos de la presente invención pueden tener un solo envase que contenga la formulación de las composiciones farmacéuticas acordes con la presente invención, acompañado o no de otros componentes (p. ej., otros compuestos o composiciones farmacéuticas de estos otros compuestos) o pueden contar con un envase distinto para cada componente.

Preferiblemente, los equipos de la invención incluyen una formulación de la invención acondicionada para ser utilizada y administrada conjuntamente con un segundo compuesto (como adyuvantes (p. ej., GM-CSF), un agente de quimioterapia, un producto natural, una hormona o un antagonista, un inhibidor o agente anti-angiogénico, un inductor de la apoptosis o un quelante) o una composición farmacéutica de los mismos. Los componentes del equipo pueden estar preagrupados o cada componente puede estar en un envase separado antes de la administración al paciente. Los componentes del equipo pueden proporcionarse en una o varias soluciones líquidas, preferiblemente en una solución acuosa y, con mayor preferencia, en una solución acuosa estéril. Los componentes del equipo también pueden facilitarse en forma de sólidos, y pueden convertirse en líquidos añadiendo los disolventes adecuados, que preferiblemente se proporcionan en otro envase distinto.

El envase de un equipo terapéutico puede ser un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, o cualquier otro medio para contener un sólido o líquido. Si hay más de un componente, normalmente el equipo contendrá un segundo vial u otro envase para permitir la dosificación por separado. El equipo también puede contener otro envase para un líquido farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente el equipo terapéutico contendrá un aparato (p. ej., una o varias agujas, jeringas, cuentagotas, pipeta, etc.) para permitir la administración de los agentes de la invención que son componentes del presente equipo.

La presente formulación puede ser toda aquella que sea adecuada para la administración de los péptidos a través de cualquier vía aceptable como la oral (enteral), nasal, oftálmica, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa o transdérmica. Se prefiere la administración subcutánea y, con mayor preferencia, la intradérmica tal vez a través de una bomba de infusión.

- 5 Puesto que el péptido de la invención se aisló del cáncer de ovario, el medicamento de la invención se usa preferentemente para tratar ese tipo de cáncer.

Preferentemente, los péptidos incluidos en la vacuna se identificarán con el método consistente en: (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; (b) comparación de los péptidos identificados con (a) un archivo (base de datos) de péptidos como el descrito antes; y
 10 (c) selección de al menos un péptido de la base de datos que presente correlación con un péptido asociado a tumor identificado en el paciente. Por ejemplo, los TUMAP presentados por la muestra del tumor se identifican mediante: (a1) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal del mismo tipo de tejido de la muestra tumoral para identificar proteínas que se sobreexpresen o se expresen de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de
 15 ligandos MHC unidos a moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Preferentemente, las secuencias de los ligandos MHC se identifican eluyendo los péptidos unidos de las moléculas MHC aisladas de la muestra tumoral y secuenciando los ligandos eluidos. Preferentemente, la muestra tumoral y el tejido normal se obtienen del mismo paciente.

20 Los TUMAP también se pueden identificar en el paciente *de novo* e incluirse después en la vacuna. A modo de ejemplo, los TUMAP candidatos se pueden identificar en el paciente mediante (a) comparación de los datos de expresión de la muestra tumoral con los datos de expresión de una muestra de tejido normal que corresponde al tipo de tejido de la muestra del tumor para identificar proteínas que se sobreexpresan o se expresan de modo aberrante en la muestra tumoral; y (a2) correlación de los datos de expresión con secuencias de ligandos MHC unidos a
 25 moléculas MHC de clase I y/o clase II en la muestra tumoral para identificar ligandos MHC derivados de proteínas que son sobreexpresadas o expresadas de modo aberrante por el tumor. Como otro ejemplo, se pueden identificar proteínas portadoras de mutaciones que sean exclusivas de la muestra tumoral en comparación con el correspondiente tejido normal del paciente, así como encontrar TUMAP que permitan reconocer específicamente la mutación. Por ejemplo, el genoma del tumor y el del tejido normal correspondiente se pueden secuenciar mediante
 30 secuenciación hologenómica: Para descubrir mutaciones que no sean sinónimas en las regiones codificadoras de las proteínas de los genes, se extraen el ADN y el ARN genómicos de tejidos tumorales y el ADN genómico germinal normal y no mutado de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La estrategia de secuenciación de nueva generación (NGS) aplicada queda limitada a la re-secuenciación de las regiones codificantes de proteínas (re-secuenciación del exoma). Con este objeto, se captura el ADN exómico de muestras humanas con equipos de
 35 enriquecimiento dirigido suministrados por el proveedor y se procede a la secuenciación con p. ej., un secuenciador HiSeq2000 (Illumina). Además, se secuencia el ARNm del tumor para determinar la cuantificación directa de la expresión génica y la validación de que los genes mutados se expresan en los tumores del paciente. Los millones de lecturas de secuencia resultantes se procesan con algoritmos informáticos. La lista de resultados contiene mutaciones y la expresión génica. Las mutaciones somáticas específicas del tumor se determinan comparándolas
 40 con las variaciones germinales derivadas de las PBMC y se priorizan. Los péptidos identificados *de novo* pueden ser analizados para determinar su inmunogenicidad según lo descrito antes con el archivo, y los TUMAP candidatos que posean la inmunogenicidad adecuada se escogen para la inclusión en la vacuna.

En una forma de realización indicada a título de ejemplo, los péptidos incluidos en la vacuna se identifican mediante:

- 45 (a) identificación de los péptidos asociados a tumor (TUMAP) presentes en una muestra tumoral del paciente en cuestión; y
 (b) selección de al menos un péptido identificado *de novo* en (a) y confirmación de su inmunogenicidad.

La vacuna preferiblemente es una formulación líquida consistente en los péptidos individuales disueltos en DMSO entre el 20% y el 40%, preferiblemente DMSO entre el 30% y el 35%, como aproximadamente DMSO al 33%.

50 Cada péptido se disuelve en DMSO antes de formar parte del producto. La concentración de cada solución de péptido se escoge dependiendo del número de péptidos que formarán parte del producto. Cada solución de péptido y DMSO se mezcla en partes iguales para obtener una solución que contenga todos los péptidos del producto con una concentración de ~2,5 mg/ml por péptido. La solución mezclada se diluye a 1:3 con agua para inyectables hasta alcanzar una concentración de 0,826 mg/ml por péptido en DMSO al 33%. La solución diluida se filtra con un filtro estéril de 0,22 µm. Se obtiene la solución final a granel.

55 La solución final a granel se envasa en viales y se conserva a -20°C hasta su uso. Un vial contiene 700 µl de solución que contiene 0,578 mg de cada péptido. De los cuales 500 µl (aprox. 400 µg por péptido) se aplicarán con la inyección intradérmica.

A continuación se describirá la presente invención con los ejemplos siguientes que describen las formas de

realización preferidas de los mismos, sin que con ello se pretenda limitar la invención.

Figuras

La Figura 1 muestra la expresión de HLA-A,B,C (a) y HLA-DR (b) en diferentes subgrupos de células presentes en el seno del cáncer de ovario y en el tejido ovárico benigno. En la Figura 1 se aplicó la prueba bilateral de la t de Student para muestras desapareadas con corrección de Welch debido a la varianza desigual de los dos grupos comparados. La expresión de HLA de clase I (A) y de HLA-DR (B) en distintos tipos celulares en el seno del CEO y del tejido ovárico benigno tras la disgregación enzimática se caracterizó por la presencia de marcadores distintivos en la superficie celular (compartimentos leucocitarios: CD45+, compartimentos de células tumorales/células epiteliales: CD45- EpCam+, compartimentos de células endoteliales: CD45- CD31+). Cada punto de datos representa la media de experimentos por triplicado en cada muestra. Para determinar la significación se emplearon pruebas de la t bilaterales (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Las Figuras 2A a D exponen la comparación del inmunopeptidoma determinado en el EOC con el de los tejidos benignos. (A) Perfil comparativo de las proteínas originarias de los ligandos de HLA de clase I representadas en el CEO (n=34) y en los tejidos benignos. La frecuencia de la presentación restringida por HLA de las proteínas originarias aparece indicada en el eje de ordenadas (Y) de forma separada para el CEO (por encima del eje de abscisas, X) y para los tejidos benignos (por debajo de dicho eje). Las proteínas originarias aparecen ordenadas de izquierda a derecha por su frecuencia de presentación específica en el CEO. El recuadro del lado izquierdo destaca las proteínas originarias de los 100 primeros ligandos de HLA que son presentados exclusivamente en el marco del CEO. (B) Nube de palabras de las proteínas originarias de los 100 primeros ligandos de HLA de clase I que son específicos del CEO (los nombres de los genes son los recomendados por Uniprot). El tamaño tipográfico de los caracteres (5 a 26) indica el número absoluto de pacientes oncológicas que presentaban los ligandos de HLA de cada proteína originaria. (C) Perfil comparativo de las proteínas originarias de los ligandos de HLA de clase II representados en el CEO (n=22) y en los tejidos benignos. (D) Nube de palabras de las proteínas originarias de los 100 primeros ligandos de HLA de clase II que son específicos del CEO (los nombres de los genes son los recomendados por Uniprot). El tamaño tipográfico de los caracteres (3 a 11) indica el número absoluto de pacientes oncológicas que presentaban los ligandos de HLA de cada proteína originaria.

La Figura 3 muestra el origen celular de los 100 primeros ligandos de HLA de clase I asociados al CEO. Gráficos de dispersión (*Volcano plots*) de la abundancia relativa de los ligandos de HLA en el inmunopeptidoma de clase I de poblaciones enriquecidas de células del CaOv 84 analizadas mediante cuantificación sin marcaje. Los recuadros de la izquierda (A) muestran la comparación de los leucocitos infiltrados en el tumor (CD45+) con las células tumorales (CD45- Epcam+), y los de la derecha (B) la comparación de las células estromales (CD45- EpCam-) con las células tumorales. La línea discontinua horizontal señala el límite de significación ($p < 0,05$). Aparecen resaltados los 100 primeros ligandos exclusivos del CEO (MUC16 (en rojo), DDR1, EYA2, SOX9, TLR7 y OASL), así como los ligandos derivados de antígenos asociados a los leucocitos (CD132, CD8 y LSP1) y de antígenos asociados al estroma (célula endotelial) (vWF).

La Figura 4 muestra la tinción con métodos inmunohistoquímicos y las concentraciones en suero como indicadores indirectos de la presentación de los ligandos. Tinción inmunohistoquímica de la MUC16 (CA-125) en carcinomas serosos de ovario de alto grado con puntuación de inmunorreactividad (A) baja (IRS4), intermedia (IRS6) y alta (IRS12). Tinción inmunohistoquímica de la mesotelina (derecha, IRS8) y de IDO1 (izquierda, IRS12; todas a 200 aumentos) (B). Correlación entre la presentación del ligando del HLA y la expresión de la proteína originaria correspondiente a antígenos seleccionados entre los 100 primeros asociados al CEO. La expresión de MUC16 (n=23), de IDO1 (n=23) y de MSLN (n=16) se analizó por medio de la tinción inmunohistoquímica (C) o del análisis del marcador sérico CA-125 (n=30) el día de la intervención quirúrgica (D). De la MSLN solo constan aquellos casos en que se dispuso de los datos referentes al inmunopeptidoma de HLA de clase II. Se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para analizar la significación estadística (límite de significación $p < 0,05$).

La Figura 5 expone la relevancia pronóstica de MUC16 y de MSLN. Se sometieron a tinción inmunohistoquímica las micromatrices tisulares (TMA) portadoras de 71 muestras de CEO seroso de alto grado procedentes de pacientes que habían sido sometidas a una citorreducción óptima del tumor. (A) Gráfica de Kaplan-Meier que muestra la influencia sobre la supervivencia total de la expresión de MUC16 (recuadro izquierdo, puntuación de expresión baja < 7 , n=41; expresión alta ≥ 7 , n=30) y de la expresión de MSLN (recuadro derecho, expresión baja < 6 , n=15; expresión alta ≥ 6 , n=52). (B) Influencia sobre la supervivencia total de las pacientes que tuvo la infiltración de linfocitos T CD3 en el compartimento intraepitelial (recuadro izquierdo CD3E, infiltración baja < 7 células/HPF, n=13; infiltración alta ≥ 7 , n=57) o en el estroma fibrovascular (recuadro derecho, CD3S, infiltración baja < 7 células/HPF, n=40; infiltración alta ≥ 7 , n=30). HPF: campo de gran aumento. (C) Análisis de subgrupos de la tinción combinada de CD3 y de MSLN (los mismos valores límite de puntuación que antes) correspondientes a los linfocitos T CD3 intraepiteliales (recuadro superior, MSLN baja/CD3E alto, n=11; MSLN baja/CD3E bajo, n=40; MSLN alta/CD3E bajo, n=14; MSLN alta/ CD3E alto, n=1) y a los linfocitos T CD3 fibrovasculares (recuadro inferior, MSLN baja/CD3S alto, n=30; MSLN alta/CD3S bajo, n=7; MSLN baja/CD3S bajo, n=21; MSLN alta/CD3S alto, n=8).

La Figura 6 muestra el análisis por citometría de flujo de tejidos de CEO y de tejidos ováricos benignos. A título de ejemplo se presenta la estrategia de selección aplicada al CaOv 48, que muestra la selección de los leucocitos CD45+, las células endoteliales CD45- CD31+ y las células epiteliales o tumorales CD45- EpCam+.

La Figura 7 muestra el análisis de saturación efectuado para o identificar las proteínas originarias de los ligandos de HLA de clase I correspondientes al CEO. El análisis de saturación para identificar a las proteínas originarias muestra por separado las proteínas de los ligandos de HLA de clase I (A) y las de los ligandos de HLA de clase II (B). El número medio de proteínas originarias únicas se ha calculado a partir de cada recuento original mediante 1000 muestreos aleatorios de las 34 fuentes del CEO. Se aplicó la regresión exponencial para determinar la máxima cobertura alcanzable teórica para acceder a las proteínas originarias (líneas de puntos) en el caso del CEO.

En la Figura 8 se muestra la frecuencia y el número de presentaciones de ligandos de HLA en las muestras de CEO. Se puede ver la presentación de ciertos antígenos asociados al CEO y el número de distintos péptidos presentados por el HLA (en colores distintos) correspondientes a cada CEO individual (el número de la paciente se indica en la cabecera de cada columna) para los antígenos de clase I (parte superior) y de clase II (parte inferior).

EJEMPLOS

Material y métodos

Muestras de tejido

Todas las muestras de tejido las obtuvo el Hospital Universitario de Tubinga después de contar con el consentimiento informado de las pacientes de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los protocolos de estudio fueron aprobados por el comité ético de investigación clínica local. Si no se indica lo contrario, las muestras permanecieron conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El tipado de HLA de dos dígitos se efectuó con una PCR con cebadores específicos de secuencia (SSP) con el HLA-Ready Gene System (Innotrain, Kronberg, Alemania) y fue evaluado con el software SCORE (Olerup, Estocolmo, Suecia) en el Servicio de medicina transfusional del Hospital Universitario de Tubinga. El tipado de HLA de alta resolución con cuatro dígitos se efectuó mediante secuenciación de nueva generación en un secuenciador GS Junior Sequencer con los juegos de cebadores GS GType HLA Primer (ambos de Roche, Basilea, Suiza). Los tejidos normales se obtuvieron de Bio-Options Inc, California, EE. UU.; BioServe, Beltsville, Maryland, EE. UU.; Capital BioScience Inc, Rockville, Maryland, EE. UU.; Geneticist Inc., Glendale, California, EE. UU.; Hospital Universitario de Ginebra; Hospital Universitario de Heidelberg; Hospital Universitario de Múnich; ProteoGenex Inc., Culver City, California, EE. UU.; y Hospital Universitario de Tubinga. Las pacientes otorgaron su consentimiento informado por escrito antes de la intervención quirúrgica o de la autopsia. Los tejidos se criogenizaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la extirpación y permanecieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el aislamiento de los TUMAP.

Disgregación del tejido

Las muestras de tejido del CEO y de tejido benigno ovárico y tubárico se obtuvieron de pacientes sometidas a la resección del tumor, citorreducción u ovariectomía. Los tejidos se trituraron en trozos pequeños $< 2\text{ mm}^3$ y se transfirieron a la solución de disgregación enzimática, provista de colagenasa de tipo IV 400 U/ml, dispasa 5 U/ml (ambas de Life technologies, Carlsbad, California) y DNasa 0,1 mg/ml (Roche, Basilea, Suiza) en DMEM (Life technologies) con suero fetal bovino al 10% (Lonza, Basilea, Suiza). La disgregación se efectuó en un agitador rotatorio (Infors HT, Basilea, Suiza) durante 3 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los fragmentos restantes de tejido (normalmente $< 1\%$ del peso inicial) se eliminaron con un tamiz de $100\text{ }\mu\text{m}$ (BD, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.). Las suspensiones de células sueltas se lavaron dos veces con PBS y los hematíes se lisaron con un tampón de lisis con cloruro de amonio.

Cuantificación de las moléculas de HLA en la superficie celular

La expresión en la superficie celular del HLA se determinó con el ensayo de citometría de flujo cuantitativa QIFIKIT (Dako, Glostrup, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron con el anticuerpo monoclonal pan-específico del HLA de clase I W6/32, o bien con el homónimo específico del HLA-DR, el L243, o con sus respectivos controles de isotipo. La discriminación de los tipos celulares se basó en la tinción de marcadores superficiales con anticuerpos marcados con fluorescencia que eran específicos contra CD45 (AmCyan clon 2D1, BD), CD31 (PeCy7, clon WM59, Biolegend, San Diego, California), EpCam (APC, clon HEA125, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Alemania) y CD34 (APCCy7, clon 581, Biolegend). Como marcador de viabilidad se añadió 7-AAD (BioLegend) justo antes del análisis en el citómetro de flujo del modelo LSR SORP Fortessa (BD). Cada muestra se procesó por triplicado y el cálculo de la expresión de las moléculas en la superficie se hizo con la mediana de la intensidad de la fluorescencia.

Separación de las células

La separación de las células se efectuó con dos protocolos consecutivos de separación magnética (MACS)

siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi). Las separaciones tuvieron lugar en columnas XS con un separador superMACS (ambos de Miltenyi). La primera separación perseguía la selección positiva de los leucocitos CD45⁺. La fracción negativa se enriqueció seguidamente con células tumorales EpCam⁺. Se supuso que la fracción restante de células CD45⁻ EpCam⁻ representaba la fracción de células del estroma.

5 **Aislamiento de los ligandos de HLA**

Las moléculas HLA de clase I y II se aislaron empleando la purificación por inmovinoafinidad, tal y como se ha descrito antes ⁴². El AcM W6/32 que es pan-específico de los HLA de clase I se empleó para el aislamiento de los HLA de clase I; para el aislamiento de los HLA de clase II se empleó el AcM Tü39 que es pan-específico de los HLA de clase II así como el AcM L243 que lo es de los HLA-DR.

10 **Análisis del inmunopeptidoma mediante CL-EM/EM**

El análisis del inmunopeptidoma se efectuó con un espectrómetro de masas LTQ OrbitrapXL (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) equipado con una fuente de ionización por nanonebulización y acoplado a un sistema de UHPLC Ultimate 3000 RSLC Nano UHPLC (Dionex, Sunnyvale, California, EE. UU.). Las muestras de péptido se cargaron con un 3% de disolvente B (H₂O al 20%, acetonitrilo al 80% y ácido fórmico al 0,04%) en una columna Nanotrap C18 PepMap 100 de 2 cm (Dionex) con un caudal de 4 µl/min durante 10 min. La separación se llevó a cabo en una columna C18 PepMap de 50 cm con un tamaño de partícula de 2 µm (Dionex) montada en un horno de columna operando a 50 °C. El gradiente aplicado de disolvente B varió entre el 3% y el 30% en el plazo de 140 minutos con un caudal de 175 µl/min. (Disolvente A: H₂O al 99%, ACN al 1% y ácido fórmico al 0,1%; Disolvente B: H₂O al 20%, ACN al 80% y ácido fórmico al 0,1%). Se efectuó un análisis por espectrometría de masas en modo de adquisición dependiente de datos empleando el llamado método de los cinco primeros (es decir, durante cada barrido de exploración se seleccionaron para la fragmentación los cinco iones precursores más abundantes). Los barridos de exploración se registraron en el Orbitrap a una resolución de 60.000. El análisis por EM/EM se llevó a cabo mediante disociación inducida por colisión (CID, energía de colisión normalizada 35%, tiempo de activación 30 ms, amplitud de aislamiento 1,3 m/z) con ulterior análisis en un cuadrupolo de confinamiento lineal (LTQ). El intervalo de masas correspondiente a los ligandos de HLA de clase I se limitó a 400-650 m/z con estados de carga posibles de 2+ y 3+ seleccionados para la fragmentación. En lo referente al intervalo de masas de los ligandos de HLA de clase II, este se ajustó a 300-1500 m/z permitiendo la fragmentación con estados de carga positivos ≥ 2.

Las muestras de HLA de clase I se analizaron con 5 réplicas técnicas, mientras que las muestras de HLA de clase II se adquirieron normalmente con 3 réplicas técnicas. Las series analíticas iniciales se efectuaron sin exclusión dinámica, mientras que en las series consecutivas se toleró una exclusión dinámica de 5 s.

Procesamiento y análisis de los datos de la espectrometría de masas

Los análisis de los datos de EM se efectuaron con Proteome discoverer 1.3 (ThermoFisher). Las listas de picos se cotejaron con las del proteoma humano que figuran en la base de datos Swiss-Prot (www.uniprot.org, publicada el 27 de septiembre de 2013; incluye 20.279 secuencias proteómicas revisadas) con el motor de búsqueda Mascot (Mascot 2.2.04, Matrix Science, Boston, Massachusetts, EE. UU.). La tolerancia de masa para el procesamiento se ajustó en 5 ppm para los iones precursores y en 0,5 Da para los iones fragmento. No se seleccionó ninguna especificidad de escisión, y la única modificación dinámica permitida fue la metionina oxidada. La fiabilidad de la identificación del péptido se determinó mediante un algoritmo de filtrado con un valor objetivo de $q \leq 0,05$ (FDR del 5%). Otros filtros aplicados tras el procesamiento fueron el Mascot Ionscore ≥ 20, un rango de motor de búsqueda = 1 y una longitud del péptido de 8-12 aminoácidos para los ligandos de HLA de clase I y de 12-25 aminoácidos para los ligandos de HLA de clase II. La función de agrupamiento de proteínas se desactivó para asegurar anotaciones múltiples de péptidos, si las secuencias mapeadas recaían en múltiples proteínas a causa de la conservación. La anotación del HLA se efectuó con algoritmos de predicción del HLA albergados en SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) y NETMHC 3.4 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>). Si los resultados son ambiguos se mencionan diversos alelos. En la obtención de los perfiles comparativos, en ambos conjuntos de datos se eliminaron los "éxitos únicos", es decir, aquellos péptidos únicamente presentados en una fuente con un recuento de pares espectro-péptido (PSM) ≤ 5.

La cuantificación sin marcaje de los péptidos en las células tumorales con respecto a las células CD45⁺ y en las células tumorales con respecto a las células del estroma se efectuó con Sieve 2.1 (Thermo Fisher). Se alinearon juntas como mínimo 3 réplicas de los archivos brutos de EM de cada fracción celular enriquecida, así como los resultados de las precipitaciones del MHC del tejido entero, con una variación máxima en el tiempo de retención (RT) de 2,5 min. Las imágenes (*frames*) se generaron con eventos de barrido EM² con una amplitud máxima del RT de 3,5 minutos y una tolerancia de masa de 5 ppm. Las identificaciones se importaron del Proteome discoverer con los resultados de búsqueda de Mascot (véase antes). Se recurrió a la normalización del cromatograma de la corriente total de iones (TIC) para reconciliar las diferencias en las intensidades de las muestras.

Análisis de la inmunogenicidad de los ligandos de HLA de clase I

La sensibilización de los linfocitos citotóxicos específicos de péptido (CTL) se llevó a cabo con un protocolo establecido basado en células presentadoras de antígeno artificiales (aAPC) (30). Las aAPC consistieron en

microperlas de poliestireno recubiertas de estreptavidina (5,6 µm de diámetro; Bangs Laboratories, Fishers, Indiana, EE. UU.). Las microperlas se resuspendieron a una concentración de 2×10^6 partículas por ml y se incubaron con complejos biotinilados de péptido-MHC 10 nM y con anticuerpo estimulador anti-CD28 10 nM (clon 9.3 derivado de la ATCC, Manassas, Virginia, EE. UU.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los linfocitos T se aislaron de sangre entera de donantes sanos con un kit de aislamiento celular por microperlas magnéticas CD8 (Miltenyi). Los linfocitos T se cultivaron en placas de 96 pocillos (Corning, Corning, Nueva York, EE. UU.) a razón de 1 millón de ellos en cada pocillo y se estimularon con el mismo número de aAPC cargadas en presencia de IL-12 5 ng/ml (PromoCell, Heidelberg, Alemania). Los linfocitos fueron sometidos a 3 estimulaciones en total, con intervalos de una semana entre cada una de ellas. Dos días después de cada estimulación se les añadía IL-2 a razón de 40 U/ml. La sensibilización de los linfocitos T se evaluó con la tinción de multímeros-MHC una semana después de la última ronda de estimulación.

Construcción de las micromatrices tisulares (TMA)

De los archivos del Instituto de Anatomía Patológica se recuperaron muestras consecutivas de tejido tumoral incluido en parafina procedentes de pacientes con carcinoma ovárico o tubárico seroso de alto grado (CEO) con como mínimo un estadio FIGO de II o III que habían sido operadas en el Hospital Universitario de Ginecología y Obstetricia de Tubinga entre 1999 y 2008. Una vez confirmados el subtipo histológico y el grado de acuerdo con los criterios publicados (43), en el estudio quedaron incluidos 154 casos. Se construyó una micromatriz de tejidos (TMA) tal y como se ha descrito en otro lugar (44). Para ello se utilizaron seis cilindros de 0,6 mm de diámetro de cada paciente (máximo tres tomados de dos puntos distintos del tumor primario – como mínimo dos cilindros distintos). Además, se elaboró una TMA con tejido incluido en parafina procedente de los tumores primarios de los casos recabados de forma prospectiva para llevar a cabo el análisis del ligandoma. Se hicieron cortes de 3 µm de espesor que seguidamente se rehidrataron y se sometieron al tratamiento preparatorio para el análisis inmunohistoquímico. En total 23 casos fueron susceptibles de evaluación inmunológica (*immunoscoring*) y de obtener la correlación con los datos del inmunopeptidoma.

Análisis inmunohistoquímico

En los análisis inmunohistoquímicos se usaron los siguientes anticuerpos primarios y diluciones: CD3 (1:100, SP7 monoclonal de rata, DCS, Hamburgo, Alemania), CD8 (1:200, C8/144B monoclonal de ratón, DAKO), MUC16 (1:450, M11 monoclonal de ratón, DAKO, Glostrup, Dinamarca), IDO1 (1:25, monoclonal de ratón, ABCAM, Cambridge, Reino Unido) y MSLN (1:100, SPM143 monoclonal de ratón, GeneTex, Irvine, California, EE. UU.). Los cortes de tejido se sumergieron en una solución de tampón con EDTA (pH 8,6) a 95 °C durante 36 minutos. La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo en un instrumento automático destinado a tal efecto siguiendo las instrucciones del fabricante con el kit de detección iView DAB (ambos de Ventana, Tucson, Arizona, EE. UU.).

Puntuación inmunológica

La cuantificación de los linfocitos infiltrados en el tumor (TIL) se llevó a cabo valorando en primer lugar el número medio de células teñidas por campo de gran aumento (400 X) recontando como mínimo 2 de dichos campos en cada cilindro. En el segundo paso, se calculó el número medio de linfocitos por campo de gran aumento correspondiente a cada juego triple de cilindros izquierdo y derecho, y al de todos los cilindros juntos. En los cálculos posteriores se empleó este recuento medio bilateral. Se evaluaron por separado el estroma fibrovascular del tumor (CD3S y CD8S) y el compartimento intraepitelial del mismo (CD3E y CD8E).

En lo concerniente a la expresión del CA 125, la intensidad de la tinción de IDO1 y MSLN se clasificó de 0 a 3 y este valor se multiplicó por una puntuación de 1 a 4 según el porcentaje de células tumorales (1: 0-10%; 2: 10-50%; 3: 50-80%; 4: 80-100%). En todos los parámetros, los casos se separaron en cuartiles y la mejor separación entre dos cuartiles se definió como el valor límite entre la expresión elevada y baja. De los 154 casos contenidos en la TMA, 71 pacientes habían sido sometidas a una citorreducción quirúrgica óptima del tumor (masa residual del tumor < 1 cm) y se pudo evaluar con éxito los TIL y la expresión de proteínas. La asignación de la puntuación inmunológica y el análisis de los datos clínicos corrieron a cargo de investigadores independientes.

Análisis estadístico y visualización

Siempre que no se indique otra cosa, todas las figuras y los análisis estadísticos se efectuaron con Graphpad Prism 6.0 (Graphpad software, La Jolla, California, EE. UU.) o con Microsoft Office 2010 (Microsoft). Las nubes de palabras se crearon con una aplicación en línea (www.wordle.net). El análisis de Kaplan-Meier se efectuó con el software estadístico SPSS (Versión 21, IBM Corp., Armonk, Nueva York, EE. UU.). Si no se indica otra cosa se efectuaron pruebas de la t de Student bilaterales para muestras desapareadas. Los valores de *p* inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Para verificar la normalidad se aplicó la prueba omnibus de d'Agostino-Pearson y para verificar la igualdad de varianzas la prueba de la F de Fisher. En la Figura 1 se usó la prueba de la t de Student bilateral para muestras desapareadas con corrección de Welch a causa de la desigualdad de las varianzas manifestada entre los dos grupos comparados. En la Figura 4 se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney porque no se pudo evaluar la distribución normal en todos los casos a causa del pequeño tamaño muestral. Para establecer las correlaciones entre las puntuaciones de IHQ de la MSLN y de la MUC16 se empleó la

correlación de Spearman, puesto que los conjuntos de datos no seguían la distribución normal. Los valores de *p* resultantes de comparar las dos curvas de supervivencia de Kaplan-Meier mostradas en la Figura 5 se calcularon con la prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox) en el programa Graphpad Prism.

Ejemplo 1: Recuento de HLA en la superficie celular y tipado del HLA

5 Un requisito primordial para el desarrollo de las inmunoterapias con linfocitos T es que las moléculas del MHC se expresen en la superficie de las células tumorales. Por consiguiente, los inventores analizaron y cuantificaron el número de moléculas de HLA-A, B y C así como de HLA-DR mediante citometría de flujo en distintos subtipos celulares de tumores ováricos (n=11), así como en tejidos benignos procedentes del ovario y de la trompa de Falopio (n=8) obtenidas por disgregación enzimática. El análisis pretendía realizar la cuantificación por separado de la expresión de HLA específicos de cada tipo celular correspondiente a leucocitos (CD45⁺), células tumorales/epiteliales (Epcam⁺) y células endoteliales (CD31⁺; este último solo en un subgrupo de 7 tumores ováricos). Véase la estrategia completa de selección de las células en la Figura 6. La mediana de la cantidad de moléculas HLA por célula resultó heterogénea en los distintos tipos de células y las diversas pacientes, pues varió entre ~ 5000 y 150.000 moléculas HLA de clase I y entre ~500 a 330.000 moléculas de HLA-DR. La cantidad de moléculas de HLA-A, B y C resultó significativamente mayor (p = 0,0205) en los leucocitos aislados del tumor que en el tejido benigno, lo cual indica una reacción inflamatoria en curso en el interior del tumor. Asimismo, se apreciaron diferencias acusadas en la expresión de las HLA de clase I al comparar las células tumorales con las células epiteliales procedentes de tejidos benignos. La expresión de las moléculas HLA de clase I fue significativamente mayor (p = 0,0021) en las células tumorales (~75.000 moléculas/célula), aunque siguió estando en la franja de otras células estromales como las células endoteliales (~95.000 moléculas/célula). Sorprendentemente, los inventores constataron la expresión profusa (~105.000 moléculas/célula) y hasta cierto punto extraordinariamente alta de moléculas HLA-DR en las células de CEO (>300.000 moléculas/célula), a diferencia de las células epiteliales benignas, que eran virtualmente negativas para dichas moléculas HLA-DR (p=0,0108). En conjunto, los inventores constataron que las moléculas de MHC de clase I y II se expresaban con mayor profusión en los tumores.

25 Los análisis del ligandoma del HLA y el perfil comparativo revelan la presentación de antígenos que son específicos del CEO. Con el fin de cartografiar el repertorio de ligandos de HLA del CEO, los inventores aislaron moléculas HLA del tejido tumoral en bruto y las sometieron a la espectrometría de masas para caracterizar el ligandoma de HLA en un total de 34 tumores epiteliales de ovario (véanse en la Tabla 7 las características de las pacientes y el tipado del HLA).

30

Tabla 7

ID del tumor de ovario (CaOv)	Edad	Tipo de tumor	Estadificación TNM	Tipado HLA MHC de clase I	Tipado HLA MHC de clase II
CaOv 9	65	Carcinoma seroso de ovario	T3cNxM1G2R1	A*02:01, B*07:02, C*07:02, C*12:01, A*03:01, B*40:02	DQB1*03:01, DQA1*05:01, DRB1*04:01, DRB4*01:01, DPB1*13:01, DQA1*03:01, DRB1*11:01, DRB3*02:02, DPB1*02:01
CaOv 10	60	Carcinoma seroso de ovario	T3bN1M1G2R1	A*02:01, B*44:05, C*02:02, C*15:02, A*11:01, B*51:01	DQB1*02:02, DQA1*01:01, DRB1*01:01, DRB4*01:01, DPB1*05:01, DQB1*05:01, DQA1*03:01, DRB1*09:01, DPB1*04:01
CaOv 12	62	Carcinoma seroso de ovario	T3cN0G2R0	A*24:02, B*35:03, C*07:01, C*12:03, A*31:01, B*49:01	DQB1*03:01, DQA1*01:02, DRB1*01:01, DRB4*01:01, DPB1*05:01, DQB1*05:04, DQA1*03:01, DRB1*04:01, DPB1*02:01
CaOv 13	62	Carcinoma seroso de ovario	T1cN1G3R0	A*02, B*35, B*40, C*03, C*04	DQB1*04, DRB1*08, DRB1*13, DQB1*06
CaOv 15	75	Carcinoma seroso de ovario	T3cN0G3R0	A*11:01, B*07:02, C*03:03, C*07:02, A*24:02, B*55:01	DQB1*03:01, DRB1*11:01, DRB3*02:02, DQA1*05:01, DRB1*03:17, DPB1*03:01
CaOv 16	45	Carcinoma seroso de ovario	T3bN1G3R0	A*02, B*40, B*44, C*03, C*05	DQB1*06, DRB1*13, DRB1*14, DRB3, DRB1*08

(continuación)

ID del tumor de ovario (CaOv)	Edad	Tipo de tumor	Estadificación TNM	Tipado MHC de clase I	HLA	Tipado MHC de clase II	HLA
CaOv 23	29	Carcinoma seroso de ovario	T3aN1G3R0	A*01, A*03, B*08, B*35, C*04, C*07		DQB1*02, DQB1*03, DRB1*03, DRB1*12, DRB3	
CaOv 28	66	Carcinoma seroso de ovario	T2bN0G3R0	A*01:01, B*27:05, C*01:02, C*02:02	A*02:01, B*52:01	DQB1*05:01, DQA1*01:01, DRB1*01:03, DRB5*01:02, DPB1*04:01	DQB1*06:01, DQA1*03:01, DRB1*15:02, DRB5*01:11, DPB1*04:02
CaOv 39	45	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R1	A*25:01, B*07:02, C*12:03, C*07:02	A*31:01, B*18:01	DQB1*06:02, DQA1*01:02, DRB1*15:01, DRB5*01:01, DPB1*04:01, DPB1*04:02	DRB1*16:09, DRB5*01:11
CaOv 41	66	Cardinoma seroso y endometrial de ovario	T3cN0G3R1	A*02, A*24, B*18, B*51, C*02, C*12		DQB1*03, DQ7, DRB1*11, DRB3	
CaOv 43	61	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R2	A*02, A*32, B*18, B*35, C*04, C*07		DQB1*03, DQB1*05, DQ9, DRB1*01, DRB1*07, DRB4	
CaOv 45	63	Carcinoma mixto diferenciado de ovario (mayoritariamente endometriode)	T1cN0G3R0	A*01, A*23, B*08, B*44, C*04, C*07		DQB1*02, DRB1*03, DRB1*07, DRB3, DRB4	
CaOv 48	71	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R0	A*02:01, B*15:01, C*03:04, C*17:01	A*25:01, B*41:02	DQB1*03:02, DQA1*03:04, DRB1*03:01, DRB1*04:01, DRB1*13:03, DRB3*01:01, DPB4*01:01, DPB1*02:01	
CaOv 53	48	Carcinoma seroso de ovario	T3bN1G3R0	A*02, A*03, B*27, B*35, C*02, C*04		DQB1*02, DQB1*03, DQ7, DRB1*03, DRB1*11, DRB3	
CaOv 54	66	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1M1G3R2	A*02:01, B*35:01, C*04:01, C*12:03	A*11:01, B*35:03	DQB1*05:01, DQA1*01:01, DRB1*14:01, DPB1*04:01, DPB1*02:01	DQB1*05:03, DRB1*01:03, DRB3*02:02
CaOv 57	58	Carcinoma endometrioide de ovario	T1cN0G1R0	A*25, A*32, B*15, B*18, C*03, C*12		DQB1*05, DQB1*06, DRB1*01, DRB1*15, DRB5	
CaOv 58	74	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R1	A*02, A*03, B*35, C*03, C*04		DQB1*05, DRB1*01	
CaOv 59	47	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R2	A*03, A*30, B*13, C*06		DQB1*02, DRB1*07, DRB4	
CaOv 60	50	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R1	A*24:02, B*13:02, C*12:03, C*06:02	A*25:01, B*18:01	DRB1*08:01, DQB1*04:02, DQA1*04:01, DPB1*02:01, DPB1*03:01	DRB1*13:01, DQB1*06:03, DQA1*01:03
CaOv 64	56	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R1	A*01, A*25, B*08, C*07		DQB1*02, DRB1*03, DRB3	

(continuación)

ID del tumor de ovario (CaOv)	Edad	Tipo de tumor	Estadificación TNM	Tipado MHC de clase I	HLA	Tipado MHC de clase II	HLA
CaOv 65	55	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1M1G3R1	A*01, A*24, B*15, B*35, C*04, C*14		DQB1*03, DQB1*05, DRB1*10, DRB1*11, DRB3	
CaOv 66	73	Carcinoma seroso de ovario	T2bN0G3R0	A*11:01, A*29:02, B*18:01, B*44:03, C*05:01, C*16:01		DRB1*03, DRB3*0202, DQB1*02:01, DQA1*02:01, DPB1*02:02, DRB*0701, DRB4*0101, DQB1*02:02, DQA1*05:01, DPB1*03:01	
CaOv 68	69	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R1	A*02:01, B*44:02, C*06:02, C*05:01	A*01:01, B*37:01	DRB1*10:01, DRB4*04:01, DQB1*03:01, DPB1*04:01	DRB1*04:01, DQB1*05:01, DQA1*01:01
CaOv 69	68	Carcinoma seroso de ovario	T3cN0G1R1	n/d		n/d	
CaOv 70	48	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1M1G1R1	A*01, A*02, B*07, C*07		DQB1*03, DRB1*09, DRB1*14, DRB3, DRB4	DQB1*05
CaOv 72	53	Carcinoma seroso de ovario	T3bN1G3R0	A*03:01, B*08:01, C*07:02, C*07:01	A*01:01, B*07:02	DRB1*01:01, DRB3*01:01, DQB1*02:01, DPB1*04:01	DRB1*03:01, DQB1*05:01, DQA1*01:01
CaOv 73	69	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R0	A*01:01, C*07:01	B*08:01	DRB1*03:01, DRB3*01:01, DQB1*02:01, DPB1*04:01	DRB1*03:42, DRB3*01:14, DQA1*05:01
CaOv 74	79	Carcinoma endometroide de ovario	T3bNxG1R1	A*02:01, B*51:01, C*15:02	B*18:01, C*07:02	DRB1*11:04, DRB3*02:02, DQB1*03:01, DQA1*02:01, DPB1*04:02, DRB1*07:01, DRB4*01:01, DQB1*02:02, DQA1*05:01, DPB1*02:01	
CaOv 79	57	Carcinoma endometroide de ovario	T2bN0G2R0	A*01:01, B*08:01, C*07:01, C*15:02	A*31:01, B*51:01	DQB1*03:03, DRB1*07:01, DRB4*01:01, DPB1*02:01	DQA1*02:01, DRB1*09:01, DPB1*13:01
CaOv 80	93	Carcinoma seroso de ovario	T3cNxG3R2	A*25:01, B*18:01, C*12:03	A*32:01, B*39:01	DRB1*01:01, DRB3*02:02, DQB1*05:01, DQA1*05:01, DPB1*04:01	DRB1*12:01, DQB1*03:01, DQA1*01:01
CaOv 81	78	Carcinoma seroso de ovario	T3cNxG3R2	A*02:01, B*56:01, C*01:02	B*45:01, C*07:02	DRB1*04:02, DRB4*01:01, DQB1*03:01, DRBB1*11:01, DRB3*02:02, DQB1*03:02	
CaOv 82	48	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R0	A*01:01, B*08:01, C*07:01, C*12:03	A*03:01, B*38:01	DRB1*04:02, DRB4*01:01, DQB1*02:01, DQA1*03:01, DPB1*04:01, DRB1*03:01, DRB3*01:01, DQB1*03:02, DQA1*05:01, DPB1*13:01	
CaOv 83	50	Carcinoma seroso de ovario	T1cN0G2R0	A*02, A*11, B*51, B*55, C*03, C*15		DQB1*03, DRB1*09, DRB1*14, DRB3, DRB4	DQB1*05

(continuación)

ID del tumor de ovario (CaOv)	Edad	Tipo de tumor	Estadificación TNM	Tipado MHC de clase I	HLA	Tipado MHC de clase II	HLA
CaOv 84	70	Carcinoma seroso de ovario	T3cN1G3R1	A*02:01, B*44:02, C*05:01	B*07:02, C*07:02	DRB1*15:01, DRB5*01:01, DQB1*06:02, DQA1*01:02, DPB1*04:01, DPB1*04:02	

En el caso del MHC de clase I los inventores pudieron identificar 22.290 péptidos únicos (media: 1263 por muestra) derivados de 9136 proteínas originarias distintas (media: 1263 por muestra), cifra que supone >90% de la cobertura máxima alcanzable que se calculó (véase la Figura 7a).

5 **Ejemplo 2: Identificación de los primeros ligandos de HLA asociados al cáncer**

Con el fin de extraer los ligandos de HLA que fueran más específicos para el CEO de este vasto catálogo de datos, los inventores compararon las proteínas originarias de los ligandos de HLA con una base de datos interna de fuentes benignas ("base de datos del ligandoma benigno del HLA") consistente en muestras procedentes de PBMC (n=30), médula ósea (n=10), colon (n=12), ovario (n=4) y riñón (n=16). La base de datos del ligandoma benigno del HLA contiene 31.032 péptidos que representan 10.012 proteínas originarias, y se creó a partir de sangre y de médula ósea extraídas a donantes sanos, así como de tejidos normales sometidos a examen histopatológico, todos los cuales fueron analizados con el mismo conjunto exacto empleado para el CEO. En la obtención de los perfiles comparativos, en ambos conjuntos de datos se eliminaron los "éxitos únicos" (es decir, aquellos péptidos únicamente presentados en una fuente con un recuento de PSM bajo) para reconciliar los resultados positivos falsos. El análisis comparativo de los dos conjuntos de datos (véase la Figura 2A) reveló 379 proteínas originarias asociadas al MHC de clase I que eran presentadas exclusivamente por el CEO en al menos tres de las pacientes analizadas, lo que puso de manifiesto la existencia de un repertorio de péptidos del HLA que es específico del CEO. En la Figura 2B se enumeran las 100 primeras proteínas originarias específicas del CEO ordenadas por su frecuencia de presentación. El análisis reveló que la proteína originaria de ligando del HLA específico del CEO más importante era la mucina 16 (MUC16), también conocida como antígeno tumoral 125 (CA-125). En conjunto, casi el 80% de las pacientes (26 de 34) presentaron más de 80 ligandos de HLA derivados de MUC16 (véase la Tabla 8).

Tabla 8

Secuencia	SEQ ID N.º	Fuentes	HLA
AHSKITTAM	3	OvCa 80	B*39:01
AVKTETSTSER	4	OvCa 12, OvCa 79	A*31:01
AVTNVRTSI	5	Ovca 59, OvCa 60	B*13
DALTPLVTI	6	OvCa 74	B*51:01
DALVLKTV	7	OvCa 41, OvCa 74, OvCa 79, OvCa 83	B*51
DPYKATSAV	8	OvCa 10, OvCa 41, OvCa 69 OvCa 74, OvCa 79, OvCa 83	B*51
EPETTSFITY	9	OvCa 65	B*35
ERSPVIQTL	10	OvCa 80	B*39:01
ETILTFHAF	11	OvCa 48, OvCa 64, OvCa 80	A*25
EVISSRGTSM	12	OvCa 48, OvCa 60, OvCa 64, OvCa 80	A*25
EVITSSRTTI	13	OvCa 60, Ovca 64	A*25
EVTSSGRTSI	14	OvCa 60, Ovca 64, OvCa 80	A*25
FPEKTHSF	15	OvCa 65	B*35
FPHSEETTM	16	OvCa 13, OvCa 65	B*35

ES 2 807 832 T3

(continuación)

Secuencia	SEQ ID N.º	Fuentes	HLA
FPHSEITTL	17	OvCa 12, OvCa 13, OvCa 53	B*35
FQRQGQTAL	18	OvCa 48	B*15:01
GDVPRPSSL	19	OvCa 72	B*08:01
GHESHSPAL	20	OvCa 80	B*39:01
GHTTVSTSM	21	OvCa 80	B*39:01
GTHSPVTQR	22	OvCa 39, OvCa 79	A*31:01
GTSGTPVSK	23	OvCa 83	A*11
HPDPQSPGL	24	OvCa 65	B*35
IITEVITRL	547	OvCa 83	A*02
IPRVFTSSI	25	OvCa 41, OvCa 74	B*51
ISDEVVTRL	26	OvCa 16	C*05
ISIGTIPRI	27	OvCa 65	B*15:17
ISKEDVTSI	28	OvCa 65	B*15:17
ITETSAVLY	29	OvCa 65	A*01
ITRLPTSSI	30	OvCa 65	B*15:17
KDTAHTeam	31	OvCa 68	B*44:02
KEDSTALVM	32	OvCa 16	B*40/B*44
KEVTSSSSVL	33	OvCa 16, OvCa 70	B*40/B*44/?
KMISAIPTL	548	OvCa 81, OvCa 83	A*02
LPHSEITTL	34	OvCa 12, OvCa 13	B*35
LTISTHKTI	35	OvCa 65	B*15:17
LTKSEERTI	36	OvCa 65	B*15:17
QFITSTNTF	1	OvCa 60	A*24:02
RDSLYVNGF	37	OvCa 68	B*44:02
RETSTSQKI	38	OvCa 60	B*18:01
RSSGVTFSR	39	OvCa 79	A*31:01
SAFESHSTV	40	OvCa 41, OvCa 74, OvCa 79, OvCa 83	B*51
SATERSASL	41	OvCa 13, OvCa 16, OvCa 70	C*03/?
SENSETTAL	42	OvCa 16, OvCa 70	B*40/B*44/?
SEQRTSPSL	43	OvCa 70	n.a.
SESPSTIKL	44	OvCa 13, OvCa 70	B*40/?

ES 2 807 832 T3

(continuación)

Secuencia	SEQ ID N.º	Fuentes	HLA
SPAGEAHSL	45	OvCa 72, OvCa 81, OvCa 84	B*07/B*56
SPAGEAHSLLA	46	OvCa 81	B*56:01
SPHPVSTTF	47	OvCa 84	B*07:02
SPHPVTALL	48	OvCa 9, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02
SPLFQRSSL	49	Ovca 72	B*0702
SPQNLRNTL	50	OvCa 23, OvCa 72, OvCa 84	B*35/B*07:02
SPRLNTQGNTAL	51	OvCa 72, Ovca 84	B*07:02
SPSEAITRL	52	Ovca 84	B*07:02
SPSKAFASL	53	OvCa 9, OvCa 23, OvCa 39, OvCa 69, OvCa 72, OvCa 84	B*35/B*07:02
SPSSPTPKV	54	OvCa 72	B*07:02
SPSSQAPVL	55	OvCa 84	B*07:02
SQGFSHSQM	56	OvCa 48	B*15:01
SRTEVISSR	57	OvCa 53	B*27
SSAVSTTTI	58	OvCa 65	B*15:17
SSPLRVTSL	59	OvCa 69	n.a.
STASSLSK	60	OvCa 83	A*11
STETSTVLY	2	OvCa 64, OvCa 65, OvCa 68	A*01
STQRVTSM	61	OvCa 72	n.a.
STSQEIHSATK	62	OvCa 83	A*11
SVLADLVTTK	63	OvCa 72	A*03:01
SVPDILSTSW	64	OvCa 60	A*24:02
TAGPTTHQF	65	OvCa 58	C*03
TEISSRTSI	66	OvCa 12	B*49:01
TENTGKEKL	67	OvCa 16	B*40/B*44
TETEAHVF	68	OvCa 41, OvCa 80	B*18
TEVSRTEVI	69	OvCa 12	B*49:01
TExVLQGLL	70	OvCa 16, OvCa 66, OvCa 70	B*40/B*44/?
TPGGTRQSL	71	OvCa 9, OvCa 23, OvCa 39, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02/B*35
TPGNRAISL	72	OvCa 23, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02/B*35
TPNSRGETSL	73	OvCa 72	B*07:02
TSGPVTEKY	74	OvCa 58	B*35

(continuación)

Secuencia	SEQ ID N.º	Fuentes	HLA
TSPAGEAHSLSL	75	OvCa 81	n.a.
TTLPESRPS	324	OvCa 70	n.a.
TYSEKTTLF	549	OvCa 12, OvCa 41, OvCa 60, OvCa 65	A*24
VHESHSSVL	76	OvCa 80	B*39:01
VPRSAATTL	77	OvCa 23, OvCa 72, OvCa 84	B*07:02/B*35
VTSAPGRSI	78	OvCa 65	B*15:17
VTSSSRTSI	79	OvCa 65	B*15:17
YPDPSKASSAM	80	OvCa 65	B*35

Esos datos ponen de manifiesto el frecuente procesamiento y presentación de la MUC16 por parte de una multitud de alotipos distintos del sistema HLA que no guarda paralelo con ningún otro antígeno específico del CEO y que solo resulta comparable al de las proteínas de expresión constitutiva (*house-keeping*) presentadas con frecuencia (>95%), como la beta-actina (149 péptidos distintos identificados en total). Entre las 100 primeras proteínas originarias que eran específicas del CEO se identificaron otros antígenos conocidos asociados a tumor como son MUC1 o KLK10, así como antígenos con funciones inmunoevasivas comprobadas, como son la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO1) o la galectina 1 (LGALS1).

En virtud de la potencia demostrada por los linfocitos T CD4 en el mantenimiento o el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria antitumoral, los inventores usaron el mismo enfoque para analizar los péptidos presentados por moléculas MHC de clase II en el marco del CEO (n=22) y obtuvieron 9162 péptidos (media: 598 por muestra) que representaban a 2330 proteínas originarias (media: 319 por muestra), cifras que suponen más del 80% de la cobertura alcanzable (véase la Figura 7B). El conjunto de datos de los ligandos benignos del HLA correspondiente a las MHC de clase II englobó 7267 péptidos que representaban a 1719 proteínas originarias derivadas de la médula ósea (n=5), de PBMC (n=13), colon (n=2), hígado (n=7) y riñón (n=17). El análisis de los 100 primeros antígenos presentados por MHC de clase II reveló un panorama más heterogéneo y complejo (Figura 2C). Un hecho destacable es que en casi el 50% de las pacientes (10 de 22: Figura 2D) se identificaron péptidos de la mesotelina (MLSN), un ligando de MUC16, que habían sido presentados por el MHC. La propia MUC16 no se hallaba entre los 100 primeros antígenos de clase II pero, aún así, sus ligandos sí se detectaron en cuatro pacientes.

Aparte de las 100 primeras proteínas originarias de ligandos de HLA específicos del CEO, los inventores analizaron también antígenos conocidos cáncer-testículo y antígenos asociados a tumor que habían sido empleados previamente para la aplicación clínica con el fin de comprobar su abundancia (Her2neu, WT1, NY-ESO-1, hTert y p53). Identificaron así péptidos presentados por HLA que pertenecían a todos los antígenos salvo al NY-ESO-1, aunque ninguno de ellos era presentado en exclusiva por el CEO (Tabla 9). Los únicos ligandos que mostraron una presentación específica del CEO, si bien con baja frecuencia (3 de 34), fueron los ligandos de HLA de clase I de Her2neu (no, en cambio, los de HLA de clase II).

Tabla 9

SEQ ID	Her2neu	Restricción HLA	Fuentes de presentación
	ERBB2 (Receptor con actividad tirosina-proteína cinasa, erbB-2)		
554	TYLPTNASLSF	A*23/A*24	2x CaOv
153	MPNPEGRYTF	B*35	1x CaOv
152	AARPAGATL	B*07	1x CaOv
291	AIKVLRENTSPKANKE	HLA clase II	1x CaOv
292	DPSPLQRYSEDPTVPLPS	HLA clase II	2x CaOv

(continuación)

SEQ ID	Her2neu	Restricción HLA	Fuentes de presentación
	ERBB2 (Receptor con actividad tirosina-proteína cinasa, erbB-2)		
294	ELVSEFSRMARD	HLA clase II	2x PBMC
295	ELVSEFSRMARDPQ	HLA clase II	2x PBMC, 1x riñón
296	IPVAIKVIRENTSPKANKE	HLA clase II	1x CaOv
297	RRLQETELVEPLTPS	HLA clase II	2x Hígado
298	SPQPEYVNQPDVRPQPP	HLA clase II	1x CaOv
291	VKPDLSYMPIWKFPDE	HLA clase II	1x CaOv
	WT-1		
	Proteína del tumor de Wilms		
558	RMFPNAPYL	A*02	8x PBMC, 1x hígado
557	QRNMTKLQL	B*13	2x CaOv, 1x hígado, 1x PBMC
555	GVFRGIQDV	B*13	2x CaOv
550	ALLPAVPSL	A*02	1x CaOv
	hTert		
	Telomerasa transcriptasa inversa		
556	LMSVYVVVEL	A*02	2x PBMC
	p53		
	Antígeno tumoral celular p53		
552	RPILTIITL	B*07	4x PBMC, 2x hígado, 2x riñón, 3x CaOv
553	TYSPALNKMF	A*24	1x PBMC, 1x hígado, 2x CaOv
551	GRNSFEVRV	B*27	1x PBMC, 1x hígado, 1x riñón, 1x CaOv

Ejemplo 3: Origen celular de los péptidos presentados por el HLA y asociados al CEO

Puesto que el CEO no solo encarna las células cancerosas sino que también representa una mezcla heterogénea de distintos tipos de células, los inventores se preguntaron si los 100 primeros antígenos del MHC de clase I realmente eran presentados originalmente por células cancerosas. Con ese fin, digirieron tejidos de CEO y separaron los leucocitos CD45+, las células tumorales EpCam+, así como las células del estroma que eran negativas para los dos marcadores (véanse las eficiencias de enriquecimiento en la Tabla 10) y a continuación sometieron a cada uno de esos subgrupos al análisis por separado del ligandoma del HLA.

Tabla 10: Eficiencias del enriquecimiento celular:

Porcentaje de células presentes en cada fracción antes (Preselección) y después de la selección por MACS

CaOv	PreSelección			Fracción CD45 ⁺				Fracción EpCam ⁺				Fracción EpCam ⁻			
	CD45 ⁺	EpCam ⁺	Viabi- lidad	CD45 ⁺	EpCam ⁺	Viabi- lidad	CD45 ⁺	EpCam ⁺	Viabi- lidad	CD45 ⁺	EpCam ⁺	Viabi- lidad	CD45 ⁺	EpCam ⁺	Viabi- lidad
84	74,7	18,3	80,2	93,5	6,2	71,6	10,7	85,7	88,2	4,5	22,1	64,0	4,5	22,1	64,0
73	23,1	12,3	81,2	95,7	1,7	77,2	3,4	73,3	87,6	1,7	3,2	87,4	1,7	3,2	87,4
70	76,2	8,83	78,9	96	1,3	82,7	3,4	94	66,4	3,1	4,5	65,4	3,1	4,5	65,4
60	77,4	5,2	92,3	94,8	1,7	90,2	5,2	79,7	88,7	3,8	10,7	89,5	3,8	10,7	89,5
57	31,9	50,5	94,1	93,6	5,0	90,6	1,4	95,3	96,7	0,8	7,2	95,3	0,8	7,2	95,3

Los inventores recurrieron a la cuantificación sin marcaje para determinar el origen de cada uno de los ligandos de HLA identificados en un total de 5 tumores epiteliales de ovario distintos (véase en la Figura 3 un ejemplo representativo). Como cabía esperar, los ligandos de HLA derivados de la MUC16, identificados en 4 de 5 muestras de CEO, se hallaron siempre sobrerrepresentados en las células cancerosas enriquecidas, con una mediana de sobrerrepresentación de 5 veces (intervalo: 1,8 a 135 veces) dependiendo de la eficiencia del enriquecimiento. Lo mismo puede decirse de otros antígenos de esa lista de los cien primeros que aparecieron presentados con frecuencia, a saber: DDR1, SOX9, CRABP1/2, EYA2, LAMC2, MUC1 y KLK10. Con todo, en el caso de otros antígenos, sobre todo de los que es sabido que son regulados al alza por el interferón, como son los receptores de tipo *Toll* (TLR3, TLR7) o la proteína-sintasa similar a la 2'-5'-oligoadenilato-sintasa (OASL), no se pudo demostrar de manera inequívoca que fueran presentados por las células tumorales en lugar de sufrir una fuerte sobrerrepresentación por parte de los leucocitos CD45+ o de las células estromales. Aparte de los antígenos asociados a tumor, los inventores reconocieron asimismo ligandos de proteínas originarias que presentaban una expresión específica del tipo celular. Por ejemplo, se halló que ligandos derivados de CD8, CD132 o de la proteína específica de linfocito 1 (LSP1) aparecían altamente sobrerrepresentados en las células CD45+, y que el factor de von Willebrand (vWF) probablemente expresado por las células endoteliales del estroma aparecía altamente sobrerrepresentado dentro del subgrupo estromal, lo cual hace patente la solidez de este enfoque específico del tipo celular.

Ejemplo 4: Análisis de la inmunogenicidad de los ligandos derivados de MUC16

La inmunogenicidad es una propiedad imperativa para que las vacunas peptídicas sean factibles. Con el fin de evaluar la inmunogenicidad potencial de los ligandos de HLA descubiertos, los inventores recurrieron a un protocolo de sensibilización de los linfocitos T basado en células presentadoras de antígeno artificiales y en linfocitos T aislados de la sangre de donantes sanos. Los resultados de estos análisis correspondientes al antígeno asociado al CEO número uno, la MUC16, se presentan en la Tabla 11. De los 23 péptidos distintos analizados hasta el momento, 18 resultaron ser inmunogénicos como mínimo en 1/3 de los donantes. Esa tasa de reconocimiento cercana al 80% corrobora la presencia de linfocitos T vírgenes que reconocen a la MUC16 en la población humana. Resultados similares se han obtenido con otros antígenos de la lista de los 100 primeros (p. ej., IDO1, LGALS1).

Tabla 11: Análisis de la inmunogenicidad de los ligandos de HLA que se presentan en el CEO derivados de MUC16/CA-125

HLA	Secuencia	SEQ ID	Donantes positivos/analizados
A*01	STETSTVLY	2	0 / 2
A*02	IITEVITRL	547	3 / 10
A*02	KMISAIPTL	548	4 / 6
A*03	SVLADLVTTK	63	0 / 1
A*11	STSQEIHSATK	62	2 / 6
A*11	GTSGTPVSK	23	0 / 5
A*24	TYSEKTLFF	549	2 / 2
A*24	AVTNVRTSI	5	1 / 3
A*25	ETILTFHAF	11	2 / 2
A*25	EVITSSRTTI	13	1 / 1
A*25	EVTSSGRTSI	14	2 / 3
A*25	EVISSRGTSM	12	1 / 3
B*07	SPHPVTALL	48	0 / 1
B*07	SPQNLRNTL	50	1 / 1
B*07	LPHSEITTL	34	0 / 2
B*07	SPSKAFASL	53	2 / 2

(continuación)

HLA	Secuencia	SEQ ID	Donantes positivos/analizados
B*07	VPRSAATTL	77	1 / 2
B*07	TPGNRAISL	72	2 / 2
B*15	SQGFSHSQM	56	4 / 5
B*15	FQRQGQTAL	18	1 / 6
B*27	ERSPVIQTL	10	1 / 2
B*51	DALVLKTV	7	1 / 3
B*51	DPYKATSAV	8	3 / 3
8/10 alotipos	18/23 HLA ligandos		34 / 73

Ejemplo 5: Biomarcadores de la presentación de los ligandos de HLA

5 La inmunoterapia antitumoral específica de antígeno (p. ej., las vacunas peptídicas, la transferencia de linfocitos T adoptivos) requiere una selección estricta de los antígenos candidatos en un plazo de tiempo breve. El análisis del ligandoma del HLA, empero, no siempre es posible debido a la carencia de material adecuado. Una alternativa factible sería el uso de biomarcadores para predecir la presencia de ligandos de HLA en las células tumorales. A fin de evaluar si la expresión de proteínas analizada mediante técnicas inmunohistoquímicas (puntuación de inmunorreactividad o IRS) podría servir como indicador indirecto de la presentación de ligandos de HLA, los inventores analizaron mediante dichas técnicas los antígenos MUC16 e IDO1 de la lista de los 100 primeros antígenos presentados por el MHC de clase I, así como el antígeno MSLN de los 100 primeros presentados por el MHC de clase II y correlacionaron la intensidad de la tinción (Figura 4A) con la presencia o ausencia de ligandos de HLA en los mismos tumores. Tanto en el caso de la MUC16 como de la MSLN, las puntuaciones de la tinción fueron sustancialmente superiores en los tumores, que presentaron ligandos de HLA de las respectivas proteínas originarias (Figura 4C). Lo mismo se puede decir de las concentraciones de CA-125 en suero, determinadas el día de la intervención quirúrgica (Figura 4D), lo cual indica que tales parámetros sirven para la selección de los antígenos candidatos para la vacunación peptídica. En cambio, el IDO1 no mostró ninguna asociación significativa con la presentación de ligandos.

Ejemplo 6: Relevancia pronóstica del eje MUC16/MSLN

20 Dada su importancia como dianas para la inmunoterapia, los inventores quisieron evaluar si la MSLN y la MUC16 también tenían relevancia pronóstica en pacientes similares a nuestro colectivo de inmunopeptidomas. Con ese fin, los inventores analizaron la expresión de ambos antígenos, así como la magnitud de la infiltración de linfocitos T mediante inmunohistoquímica en una micromatriz de tejidos (TMA) confeccionada con tumores de ovario serosos de alto grado (estadios FIGO II y III). Con el fin de evitar factores de confusión que pudieran alterar el valor pronóstico, los inventores limitaron el análisis a 71 pacientes que habían sido objeto de una citorreducción quirúrgica óptima (masa residual inferior a 1 cm).

30 Si bien los inventores no observaron ningún efecto pronóstico de la tinción de MUC16, la tinción intensa de la MSLN sí estuvo asociada con un notable descenso liminal significativo ($p=0,0572$) de la mediana de la supervivencia total, que pasó de 50 a 28 meses (Figura 5A). A pesar de su dispar relevancia pronóstica, las puntuaciones de tinción correspondientes a la MUC16 y a la MSLN mostraron una correlación directa y altamente significativa (coeficiente de correlación de Spearman $r = 0,5237$; IC 95% = $0,3159-0,6835$, nivel de significación bilateral $p < 0,001$).

35 Para la evaluación de la infiltración de los linfocitos T, los inventores evaluaron por separado el número de linfocitos T CD3 presentes en el compartimento intraepitelial del tumor (CD3E) y en el estroma fibrovascular (CD3S). Un hecho notable es que solo el número de linfocitos T intraepiteliales mostró un impacto pronóstico significativo ($p < 0,0063$), en tanto que la infiltración del estroma circundante careció de relevancia pronóstica por sí sola (Figura 5B). Únicamente en un análisis de subgrupos que combinó la tinción de MSLN y de CD3 se pudo observar un beneficio pronóstico significativo en el caso de los tumores con baja intensidad de MSLN y elevada infiltración de linfocitos T (Figura 5C) tanto en lo concerniente a los CD3E ($p < 0,001$) como de los CD3S ($p < 0,0049$). Lo más llamativo es que la combinación de la infiltración intensa de linfocitos T en el tumor (CD3E) con la baja tinción de la MSLN definió a un subgrupo de pacientes oncológicas que gozaron de una supervivencia prolongada (10 de 11 pacientes con una supervivencia confirmada superior a 3 años).

Referencias bibliográficas

- Allison, J. P. et al., *Science* 270 (1995)
 Andersen, R. S. et al., *Nat.Protoc.* 7 (2012)
 Appay, V. et al., *Eur.J Immunol.* 36 (2006)
 Banchereau, J. et al., *Cell* 106 (2001)
 5 Beatty, G. et al., *J Immunol* 166 (2001)
 Beggs, J. D., *Nature* 275 (1978)
 Benjamini, Y. et al., *Journal of the Royal Statistical Society.Series B (Methodological)*, Vol.57 (1995)
 Boulter, J. M. et al., *Protein Eng* 16 (2003)
 Braumuller, H. et al., *Nature* (2013)
 10 Brossart, P. et al., *Blood* 90 (1997)
 Bruckdorfer, T. et al., *Curr.Pharm.Biotechnol.* 5 (2004)
 Card, K. F. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004)
 Chanock, S. J. et al., *Hum.Immunol.* 65 (2004)
 Cohen, C. J. et al., *J Mol.Recognit.* 16 (2003a)
 15 Cohen, C. J. et al., *J Immunol.* 170 (2003b)
 Cohen, S. N. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 69 (1972)
 Coligan JE et al., (1995)
 Colombetti, S. et al., *J Immunol.* 176 (2006)
 Dengjel, J. et al., *Clin Cancer Res* 12 (2006)
 20 Denkberg, G. et al., *J Immunol.* 171 (2003)
 Falk, K. et al., *Nature* 351 (1991)
 Fong, L. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001)
 Gabrilovich, D. I. et al., *Nat.Med* 2 (1996)
 Gattinoni, L. et al., *Nat.Rev.Immunol.* 6 (2006)
 25 Gnjatic, S. et al., *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003)
 Godkin, A. et al., *Int.Immunol* 9 (1997)
 Green MR et al., 4th, (2012)
 Greenfield EA, 2nd, (2014)
 Hwang, M. L. et al., *J Immunol.* 179 (2007)
 30 Jung, G. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987)
 Kibbe AH, rd, (2000)
 Krieg, A. M., *Nat.Rev.Drug Discov.* 5 (2006)
 Liddy, N. et al., *Nat.Med.* 18 (2012)
 Ljunggren, H. G. et al., *J Exp.Med* 162 (1985)
 35 Longenecker, B. M. et al., *Ann N.Y.Acad.Sci.* 690 (1993)
 Lukas, T. J. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1981)
 Lundblad RL, 3rd, (2004)
 Meziere, C. et al., *J Immunol* 159 (1997)
 Morgan, R. A. et al., *Science* 314 (2006)
 40 Mori, M. et al., *Transplantation* 64 (1997)
 Mortara, L. et al., *Clin Cancer Res.* 12 (2006)
 Mueller, L. N. et al., *J Proteome.Res.* 7 (2008)
 Mueller, L. N. et al., *Proteomics.* 7 (2007)
 Mumberg, D. et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999)
 45 Pinheiro J et al., (2015)
 Plebanski, M. et al., *Eur.J Immunol* 25 (1995)
 Porta, C. et al., *Virology* 202 (1994)
 Rammensee, H. G. et al., *Immunogenetics* 50 (1999)
 Rini, B. I. et al., *Cancer* 107 (2006)
 50 Rock, K. L. et al., *Science* 249 (1990)
 Rodenko, B. et al., *Nat.Protoc.* 1 (2006)
 Saiki, R. K. et al., *Science* 239 (1988)
 Seeger, F. H. et al., *Immunogenetics* 49 (1999)
 Sherman F et al., (1986)
 55 Singh-Jasuja, H. et al., *Cancer Immunol.Immunother.* 53 (2004)
 Small, E. J. et al., *J Clin Oncol.* 24 (2006)
 Sturm, M. et al., *BMC.Bioinformatics.* 9 (2008)
 Teufel, R. et al., *Cell Mol.Life Sci.* 62 (2005)
 Tran, E. et al., *Science* 344 (2014)
 60 Walter, S. et al., *J.Immunol.* 171 (2003)
 Walter, S. et al., *Nat Med.* 18 (2012)
 Willcox, B. E. et al., *Protein Sci.* 8 (1999)
 Zaremba, S. et al., *Cancer Res.* 57 (1997)
 Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, *CA Cancer J. Clin.* 64, 9-29 (2014).
 65 Coleman, R.L.et al *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 211-224 (2013).
 Herzog, T.J. & Pothuri, B.. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3, 604-611 (2006).

5 Kandalaft, L.E., Powell, D.J., Jr., Singh, N. & Coukos, G. J. Clin. Oncol. 29, 925-933 (2011).
 Zhang, L., et al. N. Engl. J. Med. 348, 203-213 (2003).
 Schlienger, K., et al. Clin. Cancer Res. 9, 1517-1527 (2003).
 Matsuzaki, J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 7875-7880 (2010).
 5 Fisk, B., Blevins, T.L., Wharton, J.T. & Ioannides, C.G. J. Exp. Med. 181, 2109-2117 (1995).
 Curiel, T.J., et al. Nat. Med. 10, 942-949 (2004).
 Vlad, A.M., et al. Cancer Immunol. Immunother. 59, 293-301 (2010).
 Hodi, F.S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 3005-3010 (2008).
 Robert, C., et al. Lancet 384, 1109-1117 (2014).
 10 Wolchok, J.D., et al. N. Engl. J. Med. 369, 122-133 (2013).
 Rosenberg, S.A., et al. Clin. Cancer Res. 17, 4550-4557 (2011).
 Walter, S., et al. Nat. Med. 18, 1254-1261 (2012).
 Rosenberg, S.A. Sci. Transl. Med. 4, 127ps128 (2012).
 Tran, E., et al. Science 344, 641-645 (2014).
 15 Mantia-Smaldone, G.M., Corr, B. & Chu, C.S. Hum. Vaccin. Immunother. 8, 1179-1191 (2012).
 Haridas, D., et al. FASEB J. 28, 4183-4199 (2014).
 Deng, J., et al. Cancer Metastasis Rev. 32, 535-551 (2013).
 Luo, L.Y., et al. Cancer Res. 63, 807-811 (2003).
 Uyttenhove, C., et al. Nat. Med. 9, 1269-1274 (2003).
 20 Sorensen, R.B., et al. PLoS One 4, e6910 (2009).
 van den Brule, F., et al. Lab. Invest. 83, 377-386 (2003).
 Rubinstein, N., et al. Cancer Cell 5, 241-251 (2004).
 Perez-Diez, A., et al. Blood 109, 5346-5354 (2007).
 Braumuller, H., et al. Nature 494, 361-365 (2013).
 25 Hassan, R. & Ho, M. Eur. J. Cancer 44, 46-53 (2008).
 Schoggins, J.W., et al. Nature 472, 481-485 (2011).
 Walter, S., et al. J. Immunol. 171, 4974-4978 (2003).
 Couzin-Frankel, J. Cancer immunotherapy. Science 342, 1432-1433 (2013).
 Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Nature 480, 480-489 (2011).
 30 Perez, S.A., et al. Cancer 116, 2071-2080 (2010).
 Matsushita, H., et al. Nature 482, 400-404 (2012).
 Robbins, P.F., et al. Nat. Med. 19, 747-752 (2013).
 Gubin, M.M., et al. Nature 515, 577-581 (2014).
 Andersen, R.S., et al. Cancer Res. 72, 1642-1650 (2012).
 35 Lu, Y.C., et al. Clin. Cancer Res. 20, 3401-3410 (2014).
 Rolland, P., Deen, S., Scott, I., Durrant, L. & Spendlove, I. Clin. Cancer Res. 13, 3591-3596 (2007).
 Cheng, W.F., et al. Br. J. Cancer 100, 1144-1153 (2009).
 Berlin, C., et al. Leukemia (2014).
 40 Blaustein, A. & Kurman, R.J. Blaustein's pathology of the female genital tract, (Springer, New York, NY, 2011).
 Pham, D.L., et al. Int. J. Gynecol. Pathol. 32, 358-367 (2013).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> immatics biotechnologies GmbH
- <120> Nuevos péptidos y nuevas combinaciones de péptidos para el uso en la inmunoterapia contra el cáncer epitelial de ovario y otros tipos de cáncer
- 45 <130> I32745WO
- <150> GB1512369.8
 <151> 15-07-2015
- <150> US62/192,670
 <151> 15-07-2015
- 50 <160> 558
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
- 55 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

Gln Phe Ile Thr Ser Thr Asn Thr Phe
1 5

5 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 2

Ser Thr Glu Thr Ser Thr Val Leu Tyr
1 5

10 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 3

Ala His Ser Lys Ile Thr Thr Ala Met
1 5

15 <210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 4

Ala Val Lys Thr Glu Thr Ser Thr Ser Glu Arg
1 5 10

20 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

Ala Val Thr Asn Val Arg Thr Ser Ile
1 5

25 <210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 6

Asp Ala Leu Thr Pro Leu Val Thr Ile
1 5

35 <210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 7

Asp Ala Leu Val Leu Lys Thr Val
1 5

ES 2 807 832 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 5 Glu Val Thr Ser Ser Gly Arg Thr Ser Ile
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 15
 Phe Pro Glu Lys Thr Thr His Ser Phe
 1 5
 <210> 16
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 16
 Phe Pro His Ser Glu Glu Thr Thr Thr Met
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 17
 Phe Pro His Ser Glu Ile Thr Thr Leu
 1 5
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 18
 Phe Gln Arg Gln Gly Gln Thr Ala Leu
 1 5
 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 19
 Gly Asp Val Pro Arg Pro Ser Ser Leu
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 20
 Gly Asp Val Pro Arg Pro Ser Ser Leu
 1 5
 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 20

Gly His Glu Ser His Ser Pro Ala Leu
1 5

5 <210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 21

Gly His Thr Thr Val Ser Thr Ser Met
1 5

10 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 22

Gly Thr His Ser Pro Val Thr Gln Arg
1 5

15 <210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 23

Gly Thr Ser Gly Thr Pro Val Ser Lys
1 5

20 <210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 24

His Pro Asp Pro Gln Ser Pro Gly Leu
1 5

25 <210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 25

Ile Pro Arg Val Phe Thr Ser Ser Ile
1 5

35 <210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 26

ES 2 807 832 T3

Ile Ser Asp Glu Val Val Thr Arg Leu
1 5

5 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 27

Ile Ser Ile Gly Thr Ile Pro Arg Ile
1 5

10 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 28

Ile Ser Lys Glu Asp Val Thr Ser Ile
1 5

15 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 29

Ile Thr Glu Thr Ser Ala Val Leu Tyr
1 5

20 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 30

Ile Thr Arg Leu Pro Thr Ser Ser Ile
1 5

25 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 31

Lys Asp Thr Ala His Thr Glu Ala Met
1 5

35 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 32

Lys Glu Asp Ser Thr Ala Leu Val Met
1 5

ES 2 807 832 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Arg Ser Ser Gly Val Thr Phe Ser Arg
1 5

5

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 40

Ser Ala Phe Glu Ser His Ser Thr Val
1 5

10

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 41

Ser Ala Thr Glu Arg Ser Ala Ser Leu
1 5

15

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 42

Ser Glu Asn Ser Glu Thr Thr Ala Leu
1 5

25

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 43

Ser Glu Gln Arg Thr Ser Pro Ser Leu
1 5

30

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 44

Ser Glu Ser Pro Ser Thr Ile Lys Leu
1 5

35

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 45

ES 2 807 832 T3

Ser Pro Ala Gly Glu Ala His Ser Leu
1 5

5 <210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 46

Ser Pro Ala Gly Glu Ala His Ser Leu Leu Ala
1 5 10

10 <210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 47

Ser Pro His Pro Val Ser Thr Thr Phe
1 5

15 <210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 48

Ser Pro His Pro Val Thr Ala Leu Leu
1 5

20 <210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 49

Ser Pro Leu Phe Gln Arg Ser Ser Leu
1 5

25 <210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 50

Ser Pro Gln Asn Leu Arg Asn Thr Leu
1 5

35 <210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 51

Ser Pro Arg Leu Asn Thr Gln Gly Asn Thr Ala Leu
1 5 10

ES 2 807 832 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

Ser Ser Ala Val Ser Thr Thr Thr Ile
1 5

5

<210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59

Ser Ser Pro Leu Arg Val Thr Ser Leu
1 5

10

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 60

Ser Thr Ala Ser Ser Ser Leu Ser Lys
1 5

15

<210> 61
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 61

Ser Thr Gln Arg Val Thr Thr Ser Met
1 5

25

<210> 62
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

Ser Thr Ser Gln Glu Ile His Ser Ala Thr Lys
1 5 10

30

<210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63

Ser Val Leu Ala Asp Leu Val Thr Thr Lys
1 5 10

35

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 807 832 T3

<400> 64

Ser Val Pro Asp Ile Leu Ser Thr Ser Trp
1 5 10

<210> 65

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

Thr Ala Gly Pro Thr Thr His Gln Phe
1 5

<210> 66

10 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

Thr Glu Ile Ser Ser Ser Arg Thr Ser Ile
1 5 10

<210> 67

15 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 67

Thr Glu Asn Thr Gly Lys Glu Lys Leu
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 68

Thr Glu Thr Glu Ala Ile His Val Phe
1 5

<210> 69

<211> 9

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

Thr Glu Val Ser Arg Thr Glu Val Ile
1 5

<210> 70

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

40 <223> Xaa puede ser Ser, Arg o Gly

<400> 70

ES 2 807 832 T3

Thr Glu Xaa Val Leu Gln Gly Leu Leu
1 5

5 <210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 71

Thr Pro Gly Gly Thr Arg Gln Ser Leu
1 5

10 <210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

Thr Pro Gly Asn Arg Ala Ile Ser Leu
1 5

15 <210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 73

Thr Pro Asn Ser Arg Gly Glu Thr Ser Leu
1 5 10

20 <210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 74

Thr Ser Gly Pro Val Thr Glu Lys Tyr
1 5

25 <210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 75

Thr Ser Pro Ala Gly Glu Ala His Ser Leu
1 5 10

35 <210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

Val His Glu Ser His Ser Ser Val Leu
1 5

40 <210> 77
<211> 9
<212> PRT

ES 2 807 832 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

Val Pro Arg Ser Ala Ala Thr Thr Leu
1 5

5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 78

Val Thr Ser Ala Pro Gly Arg Ser Ile
1 5

10

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 79

Val Thr Ser Ser Ser Arg Thr Ser Ile
1 5

15

<210> 80
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 80

Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Ala Ser Ser Ala Met
1 5 10

25

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 81

Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala
1 5

30

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 82

Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala
1 5 10

35

<210> 83
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 83

ES 2 807 832 T3

Ala Pro Ala Ala Trp Leu Arg Ser Ala Ala Ala
 1 5 10

5 <210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 84

Leu Pro Ser Pro Val Asp Ala Ala Phe
 1 5

10 <210> 85
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 85

Arg Gly Val Pro Ser Glu Ile Asp Ala Ala Phe
 1 5 10

15 <210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 86

Glu Ala Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg
 1 5

20 <210> 87
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 87

Ser Thr Ser Ser His Ser Leu Gln Lys
 1 5

25 <210> 88
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 88

Ala Pro His Leu His Leu Ser Ala
 1 5

35 <210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89

Ala Pro His Leu His Leu Ser Ala Ala
 1 5

<210> 90
 <211> 9

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 90
 Arg Ala Leu Ala Lys Leu Leu Pro Leu
 1 5

5

<210> 91
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 91
 Ser Ala Ala Ser Gly Ala Arg Ala Leu
 1 5

10

<210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92
 Val Leu Val Asp Gln Ser Trp Val Leu
 1 5

15

<210> 93
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 93
 Asp Tyr Leu Lys Arg Phe Tyr Leu Tyr
 1 5

20

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 94
 Ser Glu Thr Lys Asn Ala Asn Ser Leu
 1 5

25

<210> 95
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 95
 Ser Ser Asp Pro Asn Ala Val Met Tyr
 1 5

30

<210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 96

35

ES 2 807 832 T3

Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Asn Thr Leu
1 5 10

5 <210> 97
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 97

Tyr Pro Phe Asp Gly Pro Gly Asn Thr Leu Ala His
1 5 10

10 <210> 98
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 98

Asn Glu Ile Glu Arg Val Phe Val Trp
1 5

15 <210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 99

Asn Val Gly Gly Leu Ile Gly Thr Pro Lys
1 5 10

20 <210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 100

Arg Val Lys Glu Met Tyr Asn Thr Tyr
1 5

25 <210> 101
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 101

Ser Ala Pro Leu Arg Val Ser Gln Leu
1 5

35 <210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 102

Asp Thr Asp Glu Tyr Val Leu Lys Tyr
1 5

ES 2 807 832 T3

<210> 103
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 103

Lys Asp Ser Thr Lys Thr Ala Phe
1 5

<210> 104
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 104

Ser Lys Ala Pro Val Leu Thr Tyr
1 5

<210> 105
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 105

Ala Glu Tyr Thr Asp Val Leu Gln Lys Ile
1 5 10

<210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 106

Glu Tyr Thr Asp Val Leu Gln Lys Ile
1 5

<210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 107

Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala
1 5

<210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 108

Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala Val
1 5

<210> 109
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 109

ES 2 807 832 T3

<400> 109

Arg Pro His Leu Thr Ser Asp Ala Val Ala
1 5 10

<210> 110

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 110

Ser Ala Lys Ser Ile Tyr Glu Gln Arg
1 5

<210> 111

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 111

Ser Pro Glu Glu Gly Ala Arg Val Tyr
1 5

15 <210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 112

Ser Gln Tyr Pro Val Asn His Leu Val
1 5

20

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 113

Tyr Pro Val Asn His Leu Val Thr Phe
1 5

<210> 114

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 114

Ala Ala Ala Ser Ala Ile Lys Val Ile
1 5

<210> 115

<211> 11

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 115

Ile His Asp His Val Asn Pro Lys Ala Phe Phe
1 5 10

ES 2 807 832 T3

Ala Glu Ile Glu Ala Asp Arg Ser Tyr
1 5

5 <210> 123
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 123

Ala Gln Lys Val Asp Thr Arg Ala Lys
1 5

10 <210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 124

His Pro Ser Ala His Asp Val Ile Leu

1 5

15 <210> 125
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 125

Arg Ile Lys Gln Lys Ala Asp Ser Leu
1 5

20 <210> 126
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 126

Ser Glu Gly Ala Ser Arg Ser Leu Gly Leu
1 5 10

25 <210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 127

Ser Val Asp Glu Glu Gly Leu Val Leu Leu
1 5 10

35 <210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 128

Ser Val His Lys Ile Thr Ser Thr Phe
1 5

ES 2 807 832 T3

<400> 135

Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu
1 5

5

<210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 136

Lys Ile Ala Val Ala Ala Ala Ser Lys
1 5

10

<210> 137
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 137

Asn Val Met Leu Arg Lys Ile Ala Val
1 5

15

<210> 138
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 138

Arg Glu Leu Thr Asn Asp Gly Glu Leu Ile Leu
1 5 10

20

<210> 139
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 139

Val Ala Ala Ala Ser Lys Pro Ala Val
1 5

30

<210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 140

Ser Pro Asn Ala Ile Phe Lys Ala Leu
1 5

35

<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 141

ES 2 807 832 T3

Ser Ser Lys Asn Lys Pro His Val Lys Arg
 1 5 10

5 <210> 142
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142

Thr Pro Ala Ser Ala Gly His Val Trp
 1 5

10 <210> 143
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143

Tyr Thr Asp His Gln Asn Ser Ser Ser Tyr
 1 5 10

15 <210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 144

Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 1 5

20 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 145

Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys
 1 5 10

25 <210> 146
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 146

Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu
 1 5

35 <210> 147
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 147

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu
 1 5

ES 2 807 832 T3

<210> 148
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 148

Asn Leu Pro Ile Phe Leu Pro Arg Val
1 5

 <210> 149
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 149

Arg Val His Pro Glu Glu Gln Gly Trp
1 5

 <210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

 <400> 150

Thr Val Lys Pro Ser Gly Lys Pro Arg
1 5

 <210> 151
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

 <400> 151

Tyr Tyr Glu His Val Lys Ala Arg Phe
1 5

 <210> 152
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

 <400> 152

Ala Ala Arg Pro Ala Gly Ala Thr Leu
1 5
 30

 <210> 153
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 153

Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe
1 5 10

 <210> 154
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*

 <400> 154

Phe Tyr Ile Lys Thr Ser Thr Thr Val
1 5

5 <210> 155
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 155

Arg Thr Thr Glu Ile Asn Phe Lys Val
1 5

10 <210> 156
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 156

Tyr Ile Lys Thr Ser Thr Thr Val
1 5

15 <210> 157
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 157

Gly Gln Ala Ala Gln Gly Pro Thr Ile
1 5

20 <210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 158

His Arg Phe Leu Ala Glu Asp Ala Leu
1 5

25 <210> 159
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 159

Glu Glu Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala
1 5

35 <210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 160

Asn Pro Asn Glu Glu Val Ala Arg Phe
1 5

<210> 161

ES 2 807 832 T3

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu
1 5

5 <210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 168

His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu
1 5

10 <210> 169
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 169

His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr
1 5

15 <210> 170
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 170

Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met
1 5

20 <210> 171
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 171

Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe
1 5

25 <210> 172
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 172

Ala Ile Ala Glu Ile Gly Asn Gln Leu
1 5

35 <210> 173
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 173

Asp Val Ala Gln Val Thr Gly Ala Leu Arg
1 5 10

<210> 174

ES 2 807 832 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 174

5 Ser Glu Asp Leu Pro Arg Ala Val Ile
 1 5

<210> 175
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 175

Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu
 1 5

<210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 176

Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe
 1 5

<210> 177
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 177

Phe Pro Phe Gln Pro Gly Ser Val Ala Glu Val
 1 5 10

<210> 178
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 178

Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu
 1 5 10

<210> 179
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 179

Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe
 1 5

35 <400> 180

<210> 180
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 180

ES 2 807 832 T3

Asp Lys Ala Phe Thr Ala Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg
 1 5 10
 <210> 181
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 181
 Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn
 1 5 10 15
 <210> 182
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 182
 Glu Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly
 1 5 10 15
 <210> 183
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 183
 Phe Asp Lys Ala Phe Thr Ala Ala Thr Thr Glu Val Ser Arg
 1 5 10
 <210> 184
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 184
 Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn
 1 5 10
 <210> 185
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 185
 Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asp Ser Leu Tyr Val Asn
 1 5 10
 <210> 186
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 186
 Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn
 1 5 10
 <210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 807 832 T3

<400> 187

Leu Gly Pro Tyr Thr Leu Asp Arg Asn Ser Leu Tyr Val Asn Gly

1 5 10 15

5 <210> 188
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 188

Ser Thr Glu Thr Ile Thr Arg Leu Ser Thr Phe Pro Phe Val Thr Gly
 1 5 10 15

10 <210> 189
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 189

Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg
 1 5 10

15 <210> 190
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 190

Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg Phe
 1 5 10

25 <210> 191
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 191

Gly Ile Asn Phe Leu Tyr Ala Ala Thr His Glu Leu Gly His Ser
 1 5 10 15

30 <210> 192
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 192

Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg
 1 5 10

35 <210> 193
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 193

ES 2 807 832 T3

Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg Phe
 1 5 10

<210> 194
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 194
 Ser Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg
 1 5 10

<210> 195
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 195
 Ser Glu Leu Gln Trp Glu Gln Ala Gln Asp Tyr Leu Lys Arg Phe
 1 5 10 15

<210> 196
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 196
 Val Pro Tyr Asn Ile Leu Thr Pro Tyr Pro Gly Pro Arg
 1 5 10

<210> 197
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 197
 Tyr Val Pro Tyr Asn Ile Leu Thr Pro Tyr Pro Gly Pro Arg
 1 5 10

25

<210> 198
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 198
 Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu
 1 5 10

<210> 199
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 199
 Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu Leu Lys
 1 5 10 15

<210> 200
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

ES 2 807 832 T3

<400> 200
Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu
 1 5 10

<210> 201
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 201
Pro Asn Phe Ser Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe
 1 5 10 15

<210> 202
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 202
Val Met Leu Arg Lys Ile Ala Val Ala Ala Ala Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15

<210> 203
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 203
Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu Glu Leu
 1 5 10

<210> 204
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 204
Leu Gln Arg Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr
 1 5 10

<210> 205
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 205
Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys
 1 5 10

<210> 206
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 206
Asn Pro Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr
 1 5 10 15

<210> 207
 <211> 17
 <212> PRT

35 <400> 207

40

ES 2 807 832 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 207

Asp Asp Gly Gly Gln Phe Val Val Thr Thr Asn Pro Val Asn Asn Asp
 1 5 10 15

Gly

5

<210> 208
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 208

Asp Lys Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp
 1 5 10 15

Thr Pro Pro

10

<210> 209
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 209

Asp Lys Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp
 1 5 10 15

Thr Pro Pro Val
 20

15

<210> 210
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 210

Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile
 1 5 10

<210> 211
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 211

Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile Ser
 1 5 10 15

<210> 212
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 212

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Gly

<210> 213

<211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 213

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr
 1 5 10 15

5 **Gly Val Ile**

<210> 214
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 214

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Gly Val Ile Ser
 20

15 <210> 215
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 215

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Gly Val Ile Ser Val
 20

20 <210> 216
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 216

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Gly Val Ile Ser Val Val
 20

25 <210> 217
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 217

Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr
 1 5 10 15

Gly Val Ile Ser Val Val Thr
 20

ES 2 807 832 T3

<210> 218
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 218
 Asp Val Asn Thr Tyr Asn Ala Ala Ile Ala Tyr Thr Ile Leu Ser
 1 5 10 15

<210> 219
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 219
 Asp Val Asn Thr Tyr Asn Ala Ala Ile Ala Tyr Thr Ile Leu Ser Gln
 1 5 10 15

<210> 220
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 220
 Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr
 1 5 10 15

<210> 221
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 221
 Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr Pro
 1 5 10 15

Pro

<210> 222
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 222
 Glu Gly Lys Val Phe Tyr Ser Ile Thr Gly Gln Gly Ala Asp Thr Pro
 1 5 10 15

Pro Val

<210> 223
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 223
 Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val
 1 5 10 15

Ile Ser

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 230

Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile Ser
 1 5 10

5 <210> 231
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 231

Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly
 1 5 10

10 <210> 232
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 232

Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile
 1 5 10 15

20 <210> 233
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 233

Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile
 1 5 10 15

Ser

25 <210> 234
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 234

Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly
 1 5 10 15

Val Ile

30 <210> 235
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 235

Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly
 1 5 10 15

Val Ile Ser

ES 2 807 832 T3

<210> 236
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 236
 Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn
 1 5 10 15
 Thr Gly Val Ile Ser
 20

<210> 237
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 237
 Ser Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg
 1 5 10 15
 Asn Thr Gly Val Ile Ser
 20

<210> 238
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 238
 Ser Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg
 1 5 10 15
 Asn Thr Gly Val Ile Ser Val Val Thr
 20 25

<210> 239
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 239
 Ser Val Pro Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu
 1 5 10

<210> 240
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 240
 Thr Asp Gly Val Ile Thr Val Lys Arg Pro Leu Arg Phe His Asn Pro
 1 5 10 15

30 Gln

<210> 241

ES 2 807 832 T3

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 241
 Thr Arg Ala Glu Leu Asp Arg Glu Asp Phe Glu His Val Lys
 1 5 10
 5
 <210> 242
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 242
 Val Pro Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu
 1 5 10
 10
 <210> 243
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 243
 Ala Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu
 1 5 10
 15
 <210> 244
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 244
 Ala Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu
 1 5 10
 20
 <210> 245
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 245
 Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr
 1 5 10
 25
 <210> 246
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 246
 Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu
 1 5 10
 30
 <210> 247
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 247
 35
 40

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp
 1 5 10 15

5 <210> 248
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 248

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp Pro
 1 5 10 15

10 <210> 249
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 249

Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp Pro
 1 5 10 15

Ala

15 <210> 250
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 250

Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu
 1 5 10

20 <210> 251
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 251

Gly Ala Pro Val Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ser Phe Leu Ala Phe Pro
 1 5 10 15

25 Thr Leu

<210> 252
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 252

Gly Asp Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu Trp
 1 5 10 15

Pro

35 <210> 253
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

Thr Arg Ile Phe Phe Val Asn Pro Ala Pro Pro Tyr Leu
 1 5 10

5 <210> 260
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 260

Val Asp Val His Phe Asp Pro Thr Thr Ala Phe Arg Ala Pro Asp
 1 5 10 15

10 <210> 261
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 261

Val Asp Val His Phe Asp Pro Thr Thr Ala Phe Arg Ala Pro Asp Val
 1 5 10 15

15 <210> 262
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 262

Val Arg Val Trp Arg Tyr Leu Lys Gly Lys Asp Leu Val Ala Arg
 1 5 10 15

20 <210> 263
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 263

Ala Pro Val Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ser Phe Leu Ala Phe Pro Thr
 1 5 10 15

25 <210> 264
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 264

Ala Pro Val Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ser Phe Leu Ala Phe Pro Thr
 1 5 10 15

Leu

35 <210> 265
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 265

Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg
 1 5 10 15

<210> 266
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 266

5

Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro
 1 5 10 15

<210> 267
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 267

10

Asp Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Arg

<210> 268
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 268

15

Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val
 1 5 10

<210> 269
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 269

20

Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala
 1 5 10

25

<210> 270
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 270

30

Leu Ala Leu Glu Phe Arg Ala Leu Glu Pro Gln Gly Leu Leu Leu
 1 5 10 15

<210> 271
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 271

35

Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala
 1 5 10 15

<210> 272

<211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 272
 5 Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
 1 5 10
 <210> 273
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 273
 Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu
 1 5 10
 <210> 274
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 274
 Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro
 1 5 10 15
 <210> 275
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 275
 Leu Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg
 1 5 10 15
 <210> 276
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 276
 Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg
 1 5 10
 <210> 277
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 277
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg
 1 5 10 15
 <210> 278
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 278
 Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
 1 5 10 15

ES 2 807 832 T3

<210> 279
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 279

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala
 1 5 10

<210> 280
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 280

Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg
 1 5 10

<210> 281
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 281

Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
 1 5 10 15

<210> 282
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 282

Ser Thr Glu Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys
 1 5 10 15

<210> 283
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 283

Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln
 1 5 10

30 <210> 284
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 284

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly
 1 5 10

<210> 285
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 285

ES 2 807 832 T3

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 <210> 286
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 286
 Val Leu Gly Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala
 1 5 10 15
 <210> 287
 <211> 15
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 287
 Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 <210> 288
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 288
 Val Arg Gly Ser Leu Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 20 <210> 289
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 289
 Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu Leu
 1 5 10 15
 25 <210> 290
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 290
 Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu
 1 5 10 15
 <210> 291
 <211> 18
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 291
 Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
 1 5 10 15
 Pro Ser
 <210> 292

ES 2 807 832 T3

<211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 292

Asp Pro Ser Pro Leu Gln Arg Tyr Ser Glu Asp Pro Thr Val Pro Leu
1 5 10 15

5 Pro Ser Glu

<210> 293
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 293

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp
1 5 10

15 <210> 294
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 294

Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln
1 5 10

20 <210> 295
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 295

Ile Pro Val Ala Ile Lys Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala
1 5 10 15

Asn Lys Glu

25 <210> 296
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 296

Arg Arg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser
1 5 10 15

30 <210> 297
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 297

Ser Pro Gln Pro Glu Tyr Val Asn Gln Pro Asp Val Arg Pro Gln Pro
1 5 10 15

35 Pro

ES 2 807 832 T3

<210> 298
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 298

Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu
 1 5 10 15

<210> 299
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 299

Ala Ser Gly Met Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Asn Phe Val His Arg
 1 5 10 15

<210> 300
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 300

Ile Ala Ser Gly Met Arg Tyr Leu Ala Thr Leu Asn Phe Val His Arg
 1 5 10 15

<210> 301
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 301

Lys Glu Val Lys Ile Met Ser Arg Leu Lys Asp Pro Asn
 1 5 10

<210> 302
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 302

Leu Asn Gln Phe Leu Ser Ala His Gln Leu Glu Asp Lys
 1 5 10

30 <210> 303
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 303

Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 304
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 304

Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro Arg
 1 5 10 15

<210> 305
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 305
 Ser Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 306
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 306
 Ser Asn Pro Ala Tyr Arg Leu Leu Leu Ala Thr Tyr Ala Arg Pro Pro
 1 5 10 15

Arg

<210> 307
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 307
 Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu
 1 5 10 15

<210> 308
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 308
 Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg
 1 5 10 15

<210> 309
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 309
 Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro Arg
 1 5 10 15

<210> 310
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 310
 Asn Gln Leu Tyr Leu Phe Lys Asp Gly Lys Tyr Trp Arg Phe Ser Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 311
 <211> 15

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 311

Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro Arg
1 5 10 15

5 <210> 312
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 312

Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly
1 5 10 15

10 <210> 313
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 313

Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro
1 5 10 15

20 <210> 314
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 314

Ser Gly Arg Gln Val Trp Val Tyr Thr Gly Ala Ser Val Leu Gly Pro
1 5 10 15

Arg

25 <210> 315
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 315

Val Asp Pro Arg Ser Ala Ser Glu Val Asp Arg Met Phe Pro Gly
1 5 10 15

30 <210> 316
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 316

Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn
1 5 10

35 <210> 317
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 317

ES 2 807 832 T3

Leu Thr Val Lys Leu Pro Asp Gly Tyr Glu Phe Lys Phe Pro Asn Arg
 1 5 10 15

Leu Asn Leu

5 <210> 318
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 318
 Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn
 1 5 10 15

10 <210> 319
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 319
 Val Arg Gly Glu Val Ala Pro Asp Ala Lys Ser Phe Val Leu Asn Leu
 1 5 10 15

Gly

15 <210> 320
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 320

Ala Thr Ser Lys Ile Pro Leu Ala Leu
 1 5

20 <210> 321
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 321

Ile Thr Ser Ser Arg Thr Thr Ile
 1 5

25 <210> 322
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 322

Leu Asn Phe Thr Ile Thr Asn Leu Gln
 1 5

35 <210> 323
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 323

Thr Ala Thr Ser Pro Met Val Pro Ala Ser
 1 5 10

5 <210> 324
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 324

Thr Thr Leu Pro Glu Ser Arg Pro Ser
 1 5

10 <210> 325
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 325

Val Glu Leu Arg Val Leu Ala Leu Pro
 1 5

15 <210> 326
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 326

Ala Glu Asp Asn Leu Ile His Lys Phe
 1 5

20 <210> 327
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 327

Arg Glu Asp Leu Glu Arg Leu Gly Val
 1 5

30 <210> 328
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 328

Asp Thr Lys Asp Pro Ala Val Thr Glu Trp
 1 5 10

35 <210> 329
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 329

Ile Leu Ile Ser Lys Leu Leu Gly Ala
 1 5

<210> 330

ES 2 807 832 T3

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 330
 5 Ser Glu Ser Leu Arg Thr Leu Glu Phe
 1 5
 <210> 331
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 331
 Val Leu Ala Glu Leu Val Ala Lys Leu
 1 5
 <210> 332
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 332
 Ile Asn Thr Ser Ile Leu Leu Ile Phe
 1 5
 <210> 333
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 333
 Ala Leu Gln Pro Leu Leu His Thr Val
 1 5
 <210> 334
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 334
 Arg Leu Met Asp Asn Leu Pro Gln Leu
 1 5
 <210> 335
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 335
 Leu Ile Ile Ser Pro Thr Arg Glu Leu
 1 5
 <210> 336
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 336

Ala Asp Ser Lys Val Leu Leu Phe
1 5

5 <210> 337
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 337

Asp Ser Leu Leu Glu Gln Ala Asn Asn Ala Ile
1 5 10

10 <210> 338
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 338

Asp Tyr Gln Gly Ile Lys Phe Val Lys Arg
1 5 10

15 <210> 339
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 339

Glu Val Val Gly Tyr Phe Gly Arg Phe
1 5

20 <210> 340
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 340

Lys Tyr Val Lys Gly Leu Ile Ser Ile
1 5

25 <210> 341
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 341

Ser Ile Gly Thr Pro Leu Asp Pro Lys
1 5

35 <210> 342
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 342

Thr Ala Ser Asp Lys Ile Leu Ile Val
1 5

<210> 343

<211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 343

5

Gly Val Ile Lys Val Ile Ser Gly Phe
1 5

<210> 344
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 344

Lys Val Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys
1 5

<210> 345
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 345

Ser Ser Ser Glu Pro Val His Ala Lys
1 5

<210> 346
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 346

Ser Ser Ser Glu Pro Val His Ala Lys Lys
1 5 10

<210> 347
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 347

Leu Ser Asp Gln Leu Ala Gln Ala Ile
1 5

<210> 348
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 348

Leu Ser Asp Ile Val Ile Glu Lys Tyr
1 5

35

<210> 349
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 807 832 T3

<400> 349

Ser Leu Asp Asp His Val Val Ala Val
1 5

<210> 350

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 350

Ser Gln Ile Asp Gln Gln Asn Ser Val
1 5

<210> 351

10 <211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 351

Ser Thr Ile Asp Pro Ser Gly Thr Arg Ser Lys
1 5 10

<210> 352

15 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 352

Val Phe Arg Asp Gln Glu Pro Lys Ile
1 5

20

<210> 353

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 353

Val Leu Arg Glu Lys Glu Ala Ala Leu
1 5

<210> 354

<211> 9

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 354

Thr Arg Leu Gln Gln Ala Gln Ala Leu
1 5

<210> 355

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 355

Val Ala Ala Pro Glu His Ile Ser Tyr
1 5

ES 2 807 832 T3

<210> 356
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 356

Asn Ser Lys Lys Lys Val Ala Leu
1 5

<210> 357
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 357

Gln Asn Ser Lys Lys Lys Val Ala Leu
1 5

<210> 358
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 358

Arg Asp Asn Thr Val His Ser Phe
1 5

<210> 359
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 359

Lys Gln Val Ser Glu Phe Met Thr Trp
1 5

<210> 360
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 360

Lys Thr Lys Pro Gln Ser Ile Gln Arg
1 5

<210> 361
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 361

Thr His Ile Glu Leu Glu Arg Leu
1 5

<210> 362
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 362

Ile Ala Pro Lys Ile Leu Gln Leu
1 5

5 <210> 363
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 363

Asp Ile Ala Ser Val Ser Gly Arg Trp
1 5

10 <210> 364
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 364

Lys Pro Lys Gln Pro Ser Lys Ser Val
1 5

15 <210> 365
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 365

Met Pro Ala Glu Thr Ile Lys Glu Leu
1 5

20 <210> 366
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 366

Ser Ala Val Lys Glu Gly Thr Ala Met
1 5

25 <210> 367
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 367

Glu Glu Glu Lys Leu Gln Ala Ala Phe
1 5

35 <210> 368
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 368

Asp Glu Phe Asn Leu Gln Lys Met
1 5

<210> 369
<211> 8

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 369

Asp Glu Tyr Lys Val Thr Ala Phe
1 5

5 <210> 370
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 370

Glu Thr Asn Ile Gly Gly Leu Asn Trp
1 5

10 <210> 371
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 371

Phe Pro Gln Thr Ala Leu Val Ser Phe
1 5

20 <210> 372
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 372

Gly Glu Phe Gly Lys Lys Ala Asp Gly Leu Leu
1 5 10

25 <210> 373
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 373

Gly Ser Met Gly Ser Phe Ser Glu Lys
1 5

30 <210> 374
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 374

Ile Phe Leu Ile Asp Gly Val Thr Gly Arg Ile

1 5 10

35 <210> 375
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 807 832 T3

<400> 375

Ile Pro Pro Glu Val Gln Arg Ile
1 5

<210> 376

<211> 9

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 376

Ile Pro Tyr Ser Pro Asp Val Gln Ile
1 5

<210> 377

10 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 377

Gln Val Ala Pro Pro Val Leu Lys Arg
1 5

<210> 378

15 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 378

Thr Glu Lys Asn Val Ile Ala Ala Leu
1 5

<210> 379

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 379

Val Gly Lys Val Lys Phe Ala Ser Leu
1 5

<210> 380

<211> 8

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 380

Val Pro Phe Ser His Val Asn Ile
1 5

<210> 381

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 381

Val Val Tyr Gln Tyr Trp Asn Thr Lys
1 5

Ser Glu Asp Leu Asn Lys His Val Leu
1 5

5 <210> 389
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 389

Gly Glu Thr Ile His Ile Pro Thr Met
1 5

10 <210> 390
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 390

Gly Pro Lys Leu Ala Ser Arg Ile Leu
1 5

15 <210> 391
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 391

Gly Val Lys Lys Pro Thr Lys Ala Leu
1 5

20 <210> 392
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 392

Lys Glu Lys Pro Asp Pro Asn Asn Leu
1 5

25 <210> 393
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 393

Lys Val Ser Glu Arg Tyr Leu Thr Met
1 5

35 <210> 394
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 394

Leu Pro Val Phe Asp Lys Glu Glu Leu
1 5

ES 2 807 832 T3

Arg Glu Ala Val Ser Lys Glu Asp Leu
1 5

5 <210> 402
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 402

Ile Met Gly Gly Asn Ser Ile Leu His Ser Ala
1 5 10

10 <210> 403
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 403

Lys Gln Phe Glu Gly Ser Thr Ser Phe
1 5

15 <210> 404
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 404

Glu Glu Phe Leu Arg Gln Glu His Phe
1 5

20 <210> 405
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 405

Glu Thr Ile Pro Ser Glu Ile Gln Val Phe
1 5 10

25 <210> 406
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 406

Glu Val Gly Glu Ala Leu Lys Thr Val Leu
1 5 10

35 <210> 407
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 407

Lys Leu Glu Asp Leu Glu Glu Gln Leu
1 5

ES 2 807 832 T3

Lys Pro Tyr Gln Lys Val Gly Leu
1 5

5 <210> 415
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 415

Lys Gln Glu Ser Ile Val Leu Lys Leu
1 5

10 <210> 416
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 416

Asn Ala Asn Asn Arg Leu Leu Leu
1 5

15 <210> 417
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 417

Ser Glu Val Pro Asn Gly Lys Glu Val
1 5

20 <210> 418
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 418

Thr Asn Asn Ile Gly Ser Ile Ala Arg
1 5

25 <210> 419
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 419

Asp Ala Lys Gly Arg Thr Val Ser Leu
1 5

35 <210> 420
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 420

Ile Ile Lys Lys Lys Glu Asp Leu
1 5

<210> 421
<211> 9

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 421

Asp Val Ile Asp Val Val Gln Ala Leu
 1 5

5 <210> 422
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 422

Glu Glu Phe Lys Ile Thr Ser Phe
 1 5

10 <210> 423
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 423

Ser Asp Phe Glu Lys Thr Gly Phe
 1 5

20 <210> 424
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 424

Asp Glu Asp Arg Leu Leu Val Val Phe
 1 5

25 <210> 425
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 425

His His Ser Asn Ile Pro Met Ser Leu
 1 5

30 <210> 426
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 426

Leu Phe Pro Ser Leu Ile Lys Asn Leu
 1 5

35 <210> 427
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 427

Asn Thr Asn Ile Pro Ile Gly Asn Lys
1 5

5 <210> 428
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 428

Ser Asp Gln Val Ala Asp Leu Arg
1 5

10 <210> 429
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 429

Thr His Phe Ser Phe Pro Leu Arg Leu
1 5

15 <210> 430
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 430

Thr Tyr Asp Ser Val Thr Asp Lys Phe
1 5

20 <210> 431
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 431

Ala Glu Ser Leu Tyr Glu Ile Arg Phe
1 5

25 <210> 432
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 432

Asp Glu Phe Leu Gly Leu Thr His Thr Tyr
1 5 10

35 <210> 433
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 433

Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr
1 5 10

40 <210> 434
<211> 15
<212> PRT

<400> 440

Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys
 1 5 10 15

Thr Gly Asn

<210> 441

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 441

Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn Tyr Lys
 1 5 10 15

<210> 442

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 442

Gln Pro Pro His Glu Tyr Val Pro Trp Val Thr Val Asn Gly Lys Pro

1

5

10

15

15

<210> 443

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 443

Ser Pro Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Gly
 20

20

<210> 444

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 444

Ser Pro Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Gly Asn
 20

30

<210> 445

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 445

ES 2 807 832 T3

Ser Pro Leu Gln Ala Leu Asp Phe Phe Gly Asn Gly Pro Pro Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Gly Asn Leu Tyr
 20

5 <210> 446
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 446
 Gly Pro Pro Phe Ser Ser Ser Gln Ser Ile Pro Val Val Pro Arg
 1 5 10 15

10 <210> 447
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 447
 Leu Pro Ser Ser Leu Met Asn Asn Leu Pro Ala His Asp Met
 1 5 10

15 <210> 448
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 448
 Leu Pro Ser Ser Leu Met Asn Asn Leu Pro Ala His Asp Met Glu
 1 5 10 15

20 <210> 449
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 449
 Leu Pro Ser Ser Leu Met Asn Asn Leu Pro Ala His Asp Met Glu Leu
 1 5 10 15

25 <210> 450
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 450
 Ser Pro Ile Gly Glu Ile Gln Pro Leu Ser Pro Gln Pro Ser Ala Pro
 1 5 10 15

Ile

35 <210> 451
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 451

Asp Glu Val Thr Gln Pro Phe Val Ile Asp Glu Lys Thr Ala Glu Ile
 1 5 10 15

Arg

5 <210> 452
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 452

Lys Tyr Pro Glu Leu Val Leu Asp Lys Ala Leu Asp Arg Glu Glu Arg
 1 5 10 15

Pro Glu

10 <210> 453
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 453

Val Thr Gln Pro Phe Val Ile Asp Glu Lys Thr Ala Glu Ile Arg
 1 5 10 15

15 <210> 454
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 454

Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser Pro
 1 5 10 15

Asp

20 <210> 455
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 455

Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser Pro
 1 5 10 15

Asp Gly

25 <210> 456
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 456

Asp Lys Pro Ile Leu Ser Leu Gly Gly Lys Pro Leu Val Gly
 1 5 10

<210> 457
 <211> 18

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 457

Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser
 1 5 10 15

Pro Asp

5 <210> 458
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 458

Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val Ser
 1 5 10 15

Pro Asp Gly

10 <210> 459
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 459

Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val
 1 5 10 15

Ser Pro Asp

20 <210> 460
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 460

Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val Val
 1 5 10 15

Ser Pro Asp Gly
 20

25 <210> 461
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 461

grtvdgtws d 11

30 <210> 462
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 462

Lys Val Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Tyr Ala Pro Ala Leu Lys Pro Phe
1 5 10 15

<210> 463
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 463

5

Lys Val Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Tyr Ala Pro Ala Leu Lys Pro Phe
1 5 10 15

Gly

<210> 464
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 464

10

Leu Gly Gly Asp Gly Arg Thr Ile Val Asp Leu Glu Gly Thr Pro Val
1 5 10 15

Val Ser Pro Asp Gly
20

<210> 465
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 465

15

Arg Thr His Glu Ile Lys Lys Leu Ala Ser Glu Ser Val Tyr Val
1 5 10 15

<210> 466
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 466

20

Val Lys Glu Tyr Ile Leu Ser Tyr Ala Pro Ala Leu Lys Pro Phe
1 5 10 15

25

<210> 467
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 467

30

Tyr Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg
1 5 10 15

Thr Pro Gln

<210> 468
 <211> 16

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 468

Ala Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro
1 5 10 15

5 <210> 469
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 469

Ala Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro
1 5 10 15

10 **Ala**

<210> 470
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 470

Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro
1 5 10 15

20 <210> 471
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 471

Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile Pro Ala
1 5 10 15

25 <210> 472
<211> 20
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 472

Gly Tyr Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu
1 5 10 15

Arg Thr Pro Gln
20

30 <210> 473
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 473

Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg
1 5 10 15

35 <210> 474
<211> 17

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 474

Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg Thr
1 5 10 15

Pro

5 <210> 475
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 475

Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg Thr
1 5 10 15

Pro Gln

10 <210> 476
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 476

Val Ala Ala Pro Asn Leu Ser Arg Met Gly Ala Ile Pro Val Met Ile
1 5 10 15

Pro Ala

20 <210> 477
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 477

Val Ile Ile Leu Tyr Ser Gly Asp Lys Ile Tyr Asp
1 5 10

25 <210> 478
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 478

Tyr Ser Lys Thr Gln Tyr Asn Gln Val Pro Ser Glu Asp Phe Glu Arg
1 5 10 15

30 <210> 479
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 479

Lys Tyr Pro Glu Leu Val Leu Asp Lys Ala Leu Asp Arg Glu Glu Arg
1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly
 1 5 10 15

5 <210> 486
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 486

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp
 1 5 10 15

10 <210> 487
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 487

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp
 1 5 10 15

Ser

15 <210> 488
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 488

Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly
 1 5 10

20 <210> 489
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 489

Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp
 1 5 10 15

25 <210> 490
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 490

Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp Gly Asp Ser
 1 5 10 15

35 <210> 491
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 491

Ala Glu Pro Gly Tyr Leu Val Thr Lys Val Val Ala Val Asp
 1 5 10

ES 2 807 832 T3

<210> 492
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 492
 Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile
 1 5 10 15

<210> 493
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 493
 Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile
 1 5 10 15

Asp

<210> 494
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 494
 Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val
 1 5 10 15

Ile

<210> 495
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 495
 Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val
 1 5 10 15

Ile Asp

<210> 496
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 496
 Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val
 1 5 10 15

Ile Asp Met

<210> 497
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

ES 2 807 832 T3

<400> 497

Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val
 1 5 10 15

Ile Asp Met Pro
 20

<210> 498

<211> 21

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 498

Asp Ala Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val
 1 5 10 15

Ile Asp Met Pro Glu
 20

<210> 499

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 499

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu
 1 5 10

<210> 500

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 500

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val

20

1

5

10

<210> 501

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<400> 501

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile
 1 5 10 15

<210> 502

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 502

Asp Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp
 1 5 10 15

<210> 503

<211> 18

ES 2 807 832 T3

<210> 509
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 509

Ser Thr Glu Phe Arg Pro Asn Ala Pro Val Pro Leu Val Ile Asp Met
1 5 10 15

Pro

<210> 510
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 510

Ala Gly Asp Tyr Thr Ile Ala Asn Ala Arg Lys Leu Ile Asp Glu
1 5 10 15

<210> 511
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 511

Glu Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu
1 5

<210> 512
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 512

Ala Asp Ile Thr Tyr Ala Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 513
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 513

Asp Ile Thr Tyr Ala Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Val Lys
1 5 10

30 <210> 514
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 514

Lys Arg Asp Asn Tyr Gln Ile Lys Val Val Ala Ser Asp His Gly Glu
1 5 10 15

<210> 515
 <211> 17
 <212> PRT

ES 2 807 832 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 515

Lys Arg Asp Asn Tyr Gln Ile Lys Val Val Ala Ser Asp His Gly Glu
 1 5 10 15

Lys

5 <210> 516
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 516

Arg Asp Glu Ser Phe Val Ile Asp Arg Gln Ser Gly Arg Leu Lys
 1 5 10 15

10 <210> 517
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 517

Arg Asp Asn Tyr Gln Ile Lys Val Val Ala Ser Asp His Gly Glu
 1 5 10 15

15 <210> 518
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 518

Ser Pro Ser Glu Leu Asp Arg Asp Pro Ala Tyr Ala Ile Val Thr
 1 5 10 15

25 <210> 519
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 519

Thr Pro Pro Gln Phe Ser Ser Val Lys Val Ile His Val Thr Ser Pro
 1 5 10 15

Gln

30 <210> 520
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 520

Val Pro Leu Pro Asp Ile Gln Glu Phe Pro Asn Tyr
 1 5 10

35 <210> 521
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 807 832 T3

<400> 521

Gly Pro Gln Leu Phe His Met Asp Pro Ser Gly Thr Phe Val Gln
1 5 10 15

<210> 522

<211> 17

5

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 522

Asp Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln
1 5 10 15

Pro

<210> 523

10

<211> 18

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 523

Asp Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln
1 5 10 15

Pro His

<210> 524

15

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 524

Asp Ser Lys Pro Leu Tyr Thr Pro Ser Ser Ser Phe Gly Val Ser
1 5 10 15

20

<210> 525

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 525

25

Ile Gln Arg Gln Val Lys Glu Ile Asn Ser Leu Gln Ser Asp Phe Thr
1 5 10 15

<210> 526

<211> 14

<212> PRT

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 526

Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr
1 5 10

<210> 527

<211> 16

35

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 527

Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln Pro
1 5 10 15

5 <210> 528
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 528
Lys Asn Tyr Phe Glu Gly Thr Gly Tyr Ala Arg Val Pro Thr Gln Pro
1 5 10 15

His

10 <210> 529
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 529
Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile Pro
1 5 10 15

15 <210> 530
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 530
Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile Pro
1 5 10 15

Asp

20 <210> 531
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 531
Ser Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro
1 5 10 15

25 <210> 532
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 532
Ser Ser Pro Arg Val Val Pro Asn Glu Ser Ile Pro Ile Ile Pro Ile
1 5 10 15

Pro

35 <210> 533
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

Gly Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His Ser
 1 5 10 15
 <210> 540
 <211> 16
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 540
 Val Gly Gly Ala Gly Tyr Val Val Thr Ile Ser His Thr Ile His Ser
 1 5 10 15
 <210> 541
 <211> 18
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 541
 Met Thr Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg Asp
 1 5 10 15
 Ser Gly
 <210> 542
 15 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 542
 Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg
 1 5 10
 20 <210> 543
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 543
 Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg Asp Ser Gly
 25 1 5 10 15
 <210> 544
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 544
 Ser Gly Thr Phe Phe Pro Tyr Ser Ser Asn Pro Ala Asn Pro Lys
 1 5 10 15
 <210> 545
 <211> 16
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 545
 Ser Gly Thr Phe Phe Pro Tyr Ser Ser Asn Pro Ala Asn Pro Lys Pro
 1 5 10 15
 <210> 546
 <211> 14

ES 2 807 832 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 546

Thr Arg Thr Phe His Asp Leu Glu Gly Asn Ala Val Lys Arg
1 5 10

5 <210> 547
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 547

Ile Ile Thr Glu Val Ile Thr Arg Leu
1 5

10 <210> 548
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 548

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu
1 5

20 <210> 549
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 549

Thr Tyr Ser Glu Lys Thr Thr Leu Phe
1 5

25 <210> 550
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 550

Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5

30 <210> 551
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 551

Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val
1 5

35 <210> 552
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 552

Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu
1 5

40

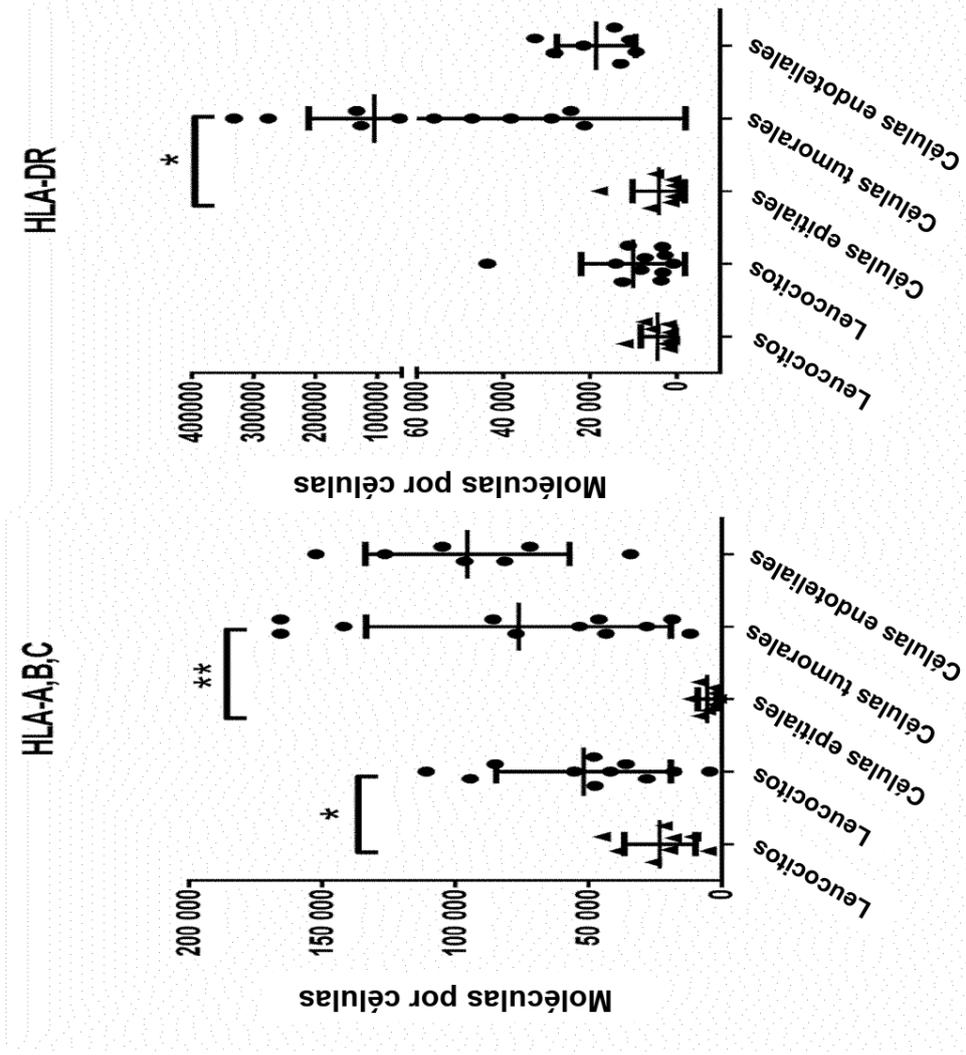
REIVINDICACIONES

1. Péptido consistente en la secuencia de aminoácidos acorde con la SEQ ID N.º 82.
2. El péptido acorde con la reivindicación 1, en el que dicho péptido incluye enlaces no peptídicos.
3. El péptido acorde con la reivindicación 1 o 2, en que dicho péptido forma parte de una proteína de fusión que, en particular comprende aminoácidos N-terminales de la cadena invariable (II) asociada al antígeno HLA-DR.
4. Receptor de linfocito T, preferiblemente un receptor de linfocito T recombinante, soluble o unido a membrana, que es reactivo con un ligando HLA, en que dicho ligando consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 82.
5. Anticuerpo, en particular un anticuerpo soluble o unido a membrana, que reconoce específicamente el péptido acorde con la reivindicación 1, preferiblemente el péptido acorde con cualquiera de la reivindicación 1 cuando está unido a una molécula del MHC.
6. Ácido nucleico, que codifica un péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 o un TCR acorde con la reivindicación 4, o un anticuerpo acorde con la reivindicación 5, opcionalmente enlazado a una secuencia promotora heteróloga, o un vector de expresión que exprese dicho ácido nucleico.
7. Célula hospedadora recombinante que comprende el péptido acorde con la reivindicación 1 o 3, o el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, en que dicha célula hospedadora es preferiblemente una célula presentadora de antígeno como una célula dendrítica, o en que dicha célula hospedadora es preferiblemente un linfocito T o una célula NK.
8. Método para producir el péptido acorde con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, o para producir el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4, o un anticuerpo acorde con la reivindicación 5, método que comprende el cultivo de la célula hospedadora acorde con la reivindicación 7 que presenta el péptido acorde con la reivindicación 1, o que expresa el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, y el aislamiento del péptido o del TCR o del anticuerpo a partir de la célula hospedadora o de su medio de cultivo.
9. Método *in vitro* para producir linfocitos T activados, método que comprende la puesta en contacto de linfocitos T *in vitro* con antígeno cargado en moléculas MHC de clase I humanas que se expresan en la superficie de una célula presentadora de antígeno adecuada o en un constructo artificial que emula a una célula presentadora de antígeno durante un período de tiempo suficiente para activar dichos linfocitos T de un modo específico de antígeno, siendo dicho antígeno un péptido acorde con la reivindicación 1.
10. Linfocito T activado, producido con el método acorde con la reivindicación 9, que reconoce selectivamente una célula que presenta un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos dada en la reivindicación 1.
11. Composición farmacéutica que comprende al menos un ingrediente activo seleccionado del grupo consistente en el péptido acorde con la reivindicación 1 o 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente, excipientes y/o estabilizantes adicionales que sean farmacéuticamente aceptables.
12. El péptido acorde con la reivindicación 1 o 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4 para el uso en medicina, preferiblemente para el uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer.
13. El péptido acorde con la reivindicación 1 o 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acordes con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4 para el uso en el diagnóstico y/o el tratamiento del cáncer acorde con la reivindicación 12, en que dicho cáncer es seleccionado entre el grupo consistente en cáncer de ovario, cáncer de pulmón amicrocítico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de riñón, cáncer de cerebro, cáncer de colon o recto, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de mama, carcinoma de células de Merkel, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de útero, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vía biliar y otros tumores que presenten una sobreexpresión de una proteína de la cual derive un péptido acorde con la SEQ ID N.º 82, en particular el cáncer de ovario.
14. Un equipo que comprende:
 - a) un envase que comprende una composición farmacéutica que contiene el péptido acorde con la reivindicación 1 o 3, el ácido nucleico o el vector de expresión acorde con la reivindicación 6, la célula acorde con la reivindicación 7, el linfocito T activado acorde con la reivindicación 10 o el anticuerpo acorde con la reivindicación 5 o el receptor de linfocito T acorde con la reivindicación 4, en solución o en forma liofilizada;

- b) opcionalmente, un segundo envase que contiene un diluyente o solución de reconstitución para la formulación liofilizada;
- c) opcionalmente, al menos un péptido más seleccionado del grupo consistente en las SEQ ID N.º 1 a 81, y 83 a 549, y
- 5 d) opcionalmente, instrucciones de (I) uso de la solución o (II) de la reconstitución y/o uso de la formulación liofilizada, y
- e) opcionalmente puede comprender, además, uno o más de los siguientes componentes: (III) un tampón, (IV) un diluyente, (V) un filtro, (VI) una aguja, o (VII) una jeringa.

Figura 1

A



B

Benigno del ovario/
trompa de Falopio

Cáncer de ovario

Figura 3

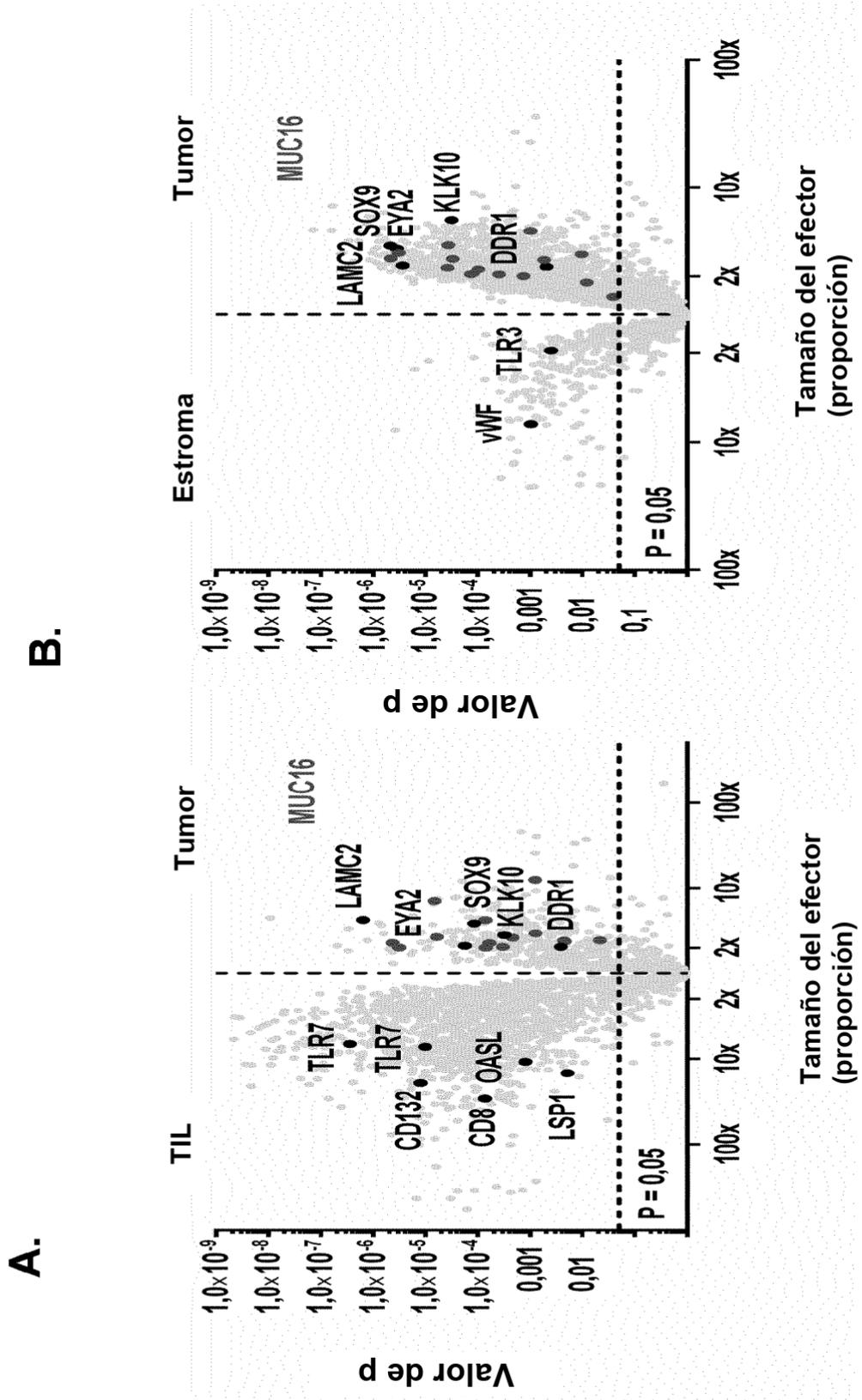


Figura 4

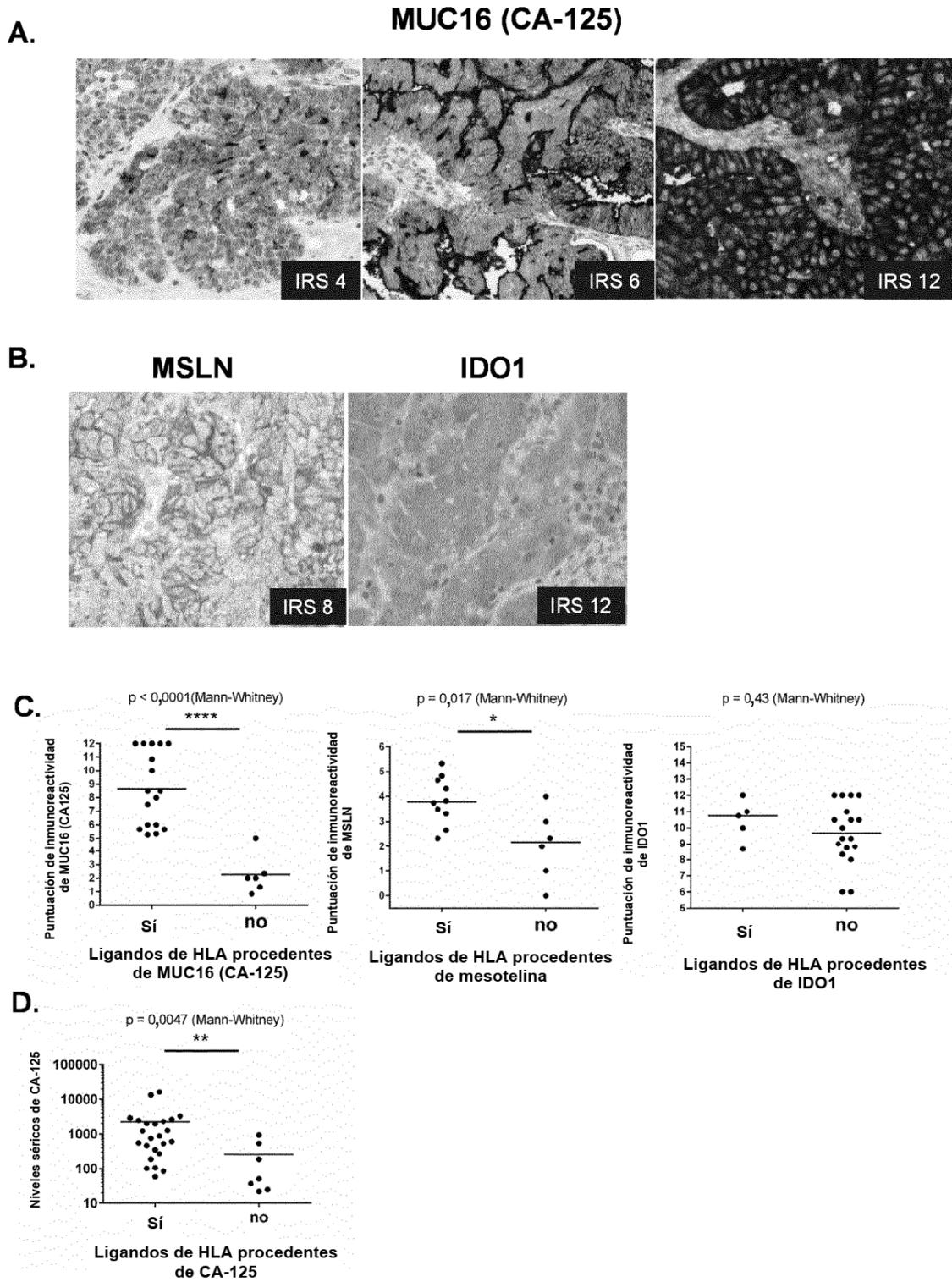
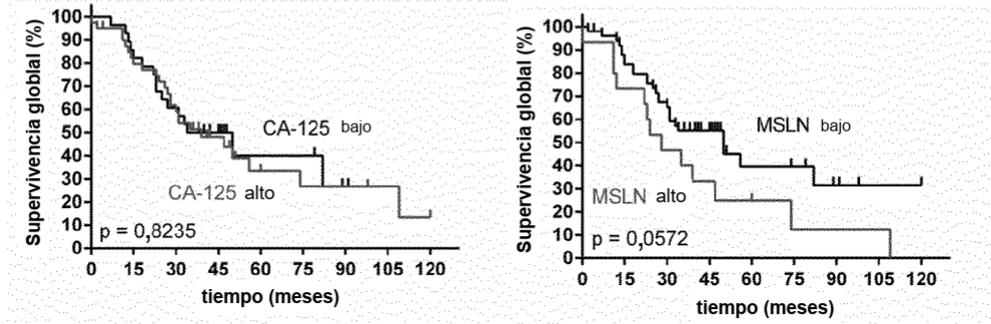
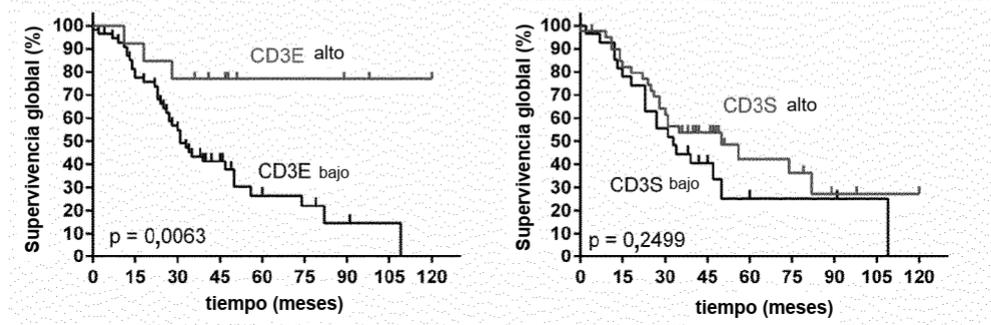


Figura 5

A.



B.



C.

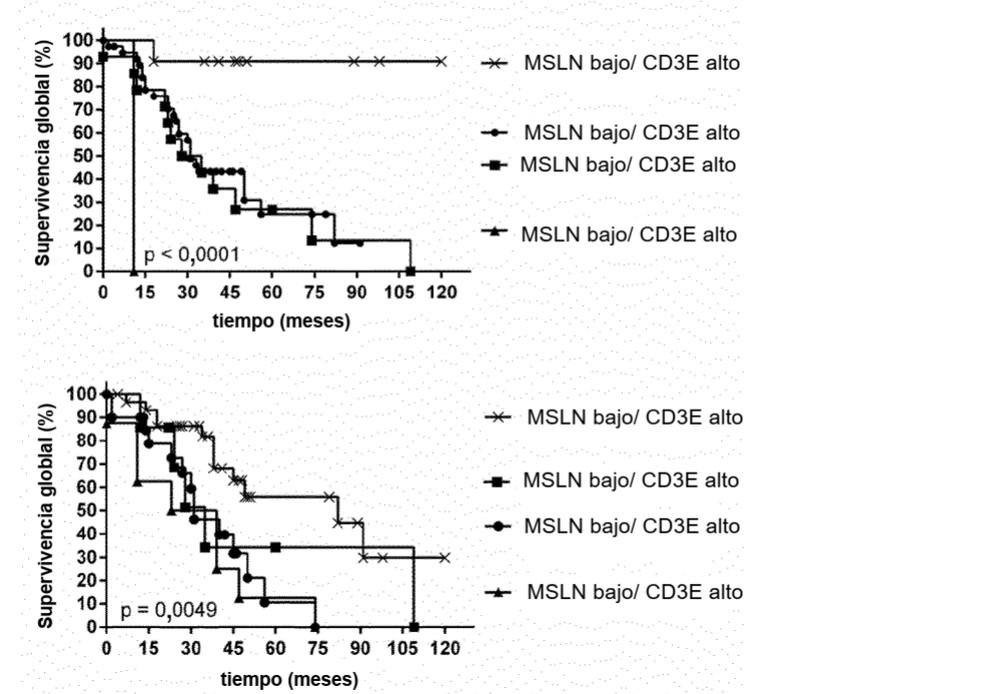


Figura 6

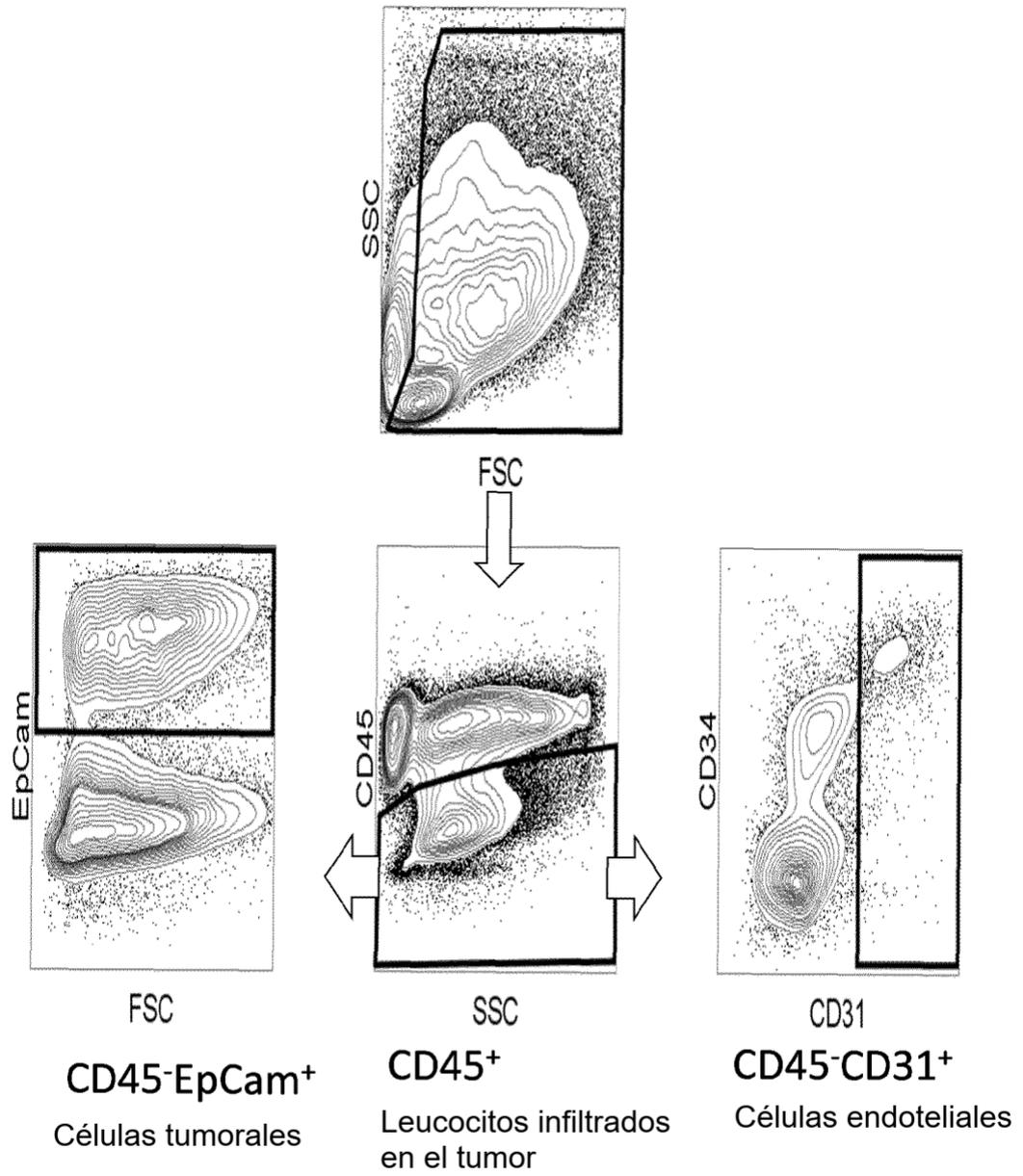


Figura 7

